

THESE DE DOCTORAT D'ETAT

SCIENCES BIOLOGIQUES

présentée à l'Université Paris - Sud centre
d'Orsay pour obtenir le grade

de DOCTEUR ES-SCIENCES

par Jacques MARTAL

L'HORMONE LACTOGENE PLACENTAIRE OVINE

Purification et propriétés physicochimiques
immunologiques et biologiques

Etude de son rôle dans les mécanismes du
contrôle de la gestation.

Soutenue le 26 Novembre 1980 devant le jury composé de :

MM C. THIBAUT	Professeur de Physiologie de la Reproduction- Faculté des Sciences Paris VI	<u>Président</u>
J. ROFFI	Professeur d'Endocrinologie Faculté des Sciences Paris-Sud	<u>Rapporteur</u>
B. RIBADEAU - DUMAS	Directeur de Recherches INRA Laboratoire de Biochimie des Protéines	Rapporteur
H. CLAUSER	Professeur honoraire de Biochimie Paris-Sud-Directeur de Recherches INRA de Labor. de Physiologie de la Lactation	<u>Directeur de Thèse</u>
A. JOST	Professeur de Physiologie du Développement, Collège de France	Examineur
H. LE BARS	Professeur de Physiologie-Thérapeutique-Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort	Examineur
G. PETRISSANT	Maître de Recherches INRA Laboratoire de Physiologie de la Lactation.	Invité

THESE DE DOCTORAT D'ETAT

SCIENCES BIOLOGIQUES

présentée à l'Université Paris - Sud centre
d'Orsay pour obtenir le grade

de DOCTEUR ES-SCIENCES

par Jacques MARTAL

L'HORMONE LACTOGENE PLACENTAIRE OVINE

Purification et propriétés physicochimiques
immunologiques et biologiques
Etude de son rôle dans les mécanismes du
contrôle de la gestation.

Soutenue le 26 Novembre 1980 devant le jury composé de :

MM C. THIBAUT	Professeur de Physiologie de la Reproduction- Faculté des Sciences Paris VI	<u>Président</u>
J. ROFFI	Professeur d'Endocrinologie Faculté des Sciences Paris-Sud	<u>Rapporteur</u>
B. RIBADEAU - DUMAS	Directeur de Recherches INRA Laboratoire de Biochimie des Protéines	Rapporteur
H. CLAUSER	Professeur honoraire de Biochimie Paris-Sud-Directeur de Recherches INRA de Labor. de Physiologie de la Lactation	<u>Directeur</u> <u>de</u> <u>Thèse</u>
A. JOST	Professeur de Physiologie du Développement, Collège de France	Examineur
H. LE BARS	Professeur de Physiologie-Thérapeu- tique-Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort	Examineur
G. PETRISSANT	Maître de Recherches INRA Laboratoire de Physiologie de la Lactation.	Invité

L'HORMONE LACTOGENE PLACENTAIRE OVINE •

Purification et propriétés physicochimiques,
immunologiques et biologiques

Etude de son rôle dans les mécanismes
du contrôle de la Gestation

• oPL : ovine Placental Lactogen

= oCS : ovine Chorionic Somatomammotropin

L'HOMME LACTOÏSE
PLACÉTAIRE OYRE

Prophète de l'humanité
L'homme l'homme
L'homme l'homme
L'homme l'homme



Leiden University Library
Leiden University Library

Au début de ce mémoire, je tiens à témoigner ma gratitude à :

- Robert DENAMUR qui créa notre Laboratoire et dont les travaux nous servent encore souvent de référence.
- Monsieur Hubert CLAUSER, Professeur de Biochimie, qui eut la très difficile tâche de lui succéder et qui modela tout notre travail par ses conseils éclairés et amicaux.
- Monsieur C. THIBAUT, Professeur de Physiologie de la Reproduction, qui créa la Station de Physiologie Animale de Jouy-en-Josas et qui, malgré ses très lourdes responsabilités, accepta de présider notre jury de Thèse.
- Monsieur A. JOST, Professeur d'Endocrinologie au Collège de France, qui nous initia à cette discipline et accepta de participer à ce jury.
- Monsieur H. LE BARS, Professeur de Physiologie à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort et à l'Institut National Agronomique, qui nous encouragea à entreprendre cette difficile voie qu'est la Recherche et qui ne cessa de nous témoigner son intérêt.
- Monsieur J. ROFFI, Professeur d'Endocrinologie à la Faculté des Sciences d'Orsay qui accepta d'être Rapporteur de notre Thèse.
- Monsieur B. RIBADEAU-DUMAS, Directeur du Laboratoire de Biochimie des Protéines à l'INRA, qui accepta aussi d'être Rapporteur de notre travail.
- Monsieur le Docteur G. Pétrissant qui nous communiqua son goût de la rigueur.

Ce travail n'a été possible que grâce à l'aide constante de mes collègues du Laboratoire de Physiologie de la Lactation. Ils sont trop nombreux pour les citer tous.

J'aimerais toutefois particulièrement remercier :

- Madame Nicole CHENE pour son aide technique compétente et assidue.
- et tous ceux qui m'ont offert leur précieuse collaboration :
Mesdames MOLITANO et BRUGNOLO, Mademoiselle M.C. LACROIX, J. DJIANE, G. KANN, P. GAYE, C. DELOUIS, J. CHARRIER, M. DUBOIS, J.P. VILA, P. HERMIER, ...
ainsi que les dessinateurs, les photographes, les techniciens animaliers et les techniciens de laboratoire et d'ateliers.

Je tiens enfin à exprimer tous mes remerciements à mon épouse qui a su m'entourer constamment de tendresse et de compréhension.

*" Acceptons avec joie que l'anneau forgé
dans la douleur prenne sa place anonyme
dans la chaîne, comme ceux qui le précè-
dent et ceux qui le suivent."*

Jeanne BLUM, 1979

Bref résumé : Une hormone lactogène placentaire ovine (oPL) ou Somatomammotrophine Chorionique ovine (oCS) a été isolée et caractérisée. Elle a été purifiée environ 1000 fois. Elle n'est contaminée ni par la prolactine (PRL) ni par l'hormone de croissance (GH). Son activité lactogène est équivalente à environ 20 UI/mg de prolactine ovine NIH standard et son activité somatotrope à environ 0,8 UI/mg d'hormone de croissance bovine NIH standard. Son poids moléculaire apparent est de 20.000 à 22.000 daltons et son point isoélectrique est d'environ 7,2. L'oCS ne présente pas de réaction immunologique croisée avec la prolactine ovine, les hormones de croissance humaine et ovine et l'hormone lactogène placentaire humaine. La structure bifonctionnelle de la molécule d'oCS a été démontrée au moyen de chromatographie d'affinité sur récepteurs spécifiques. Les propriétés lactogènes et d'hormone de croissance de l'oCS ont été mises en évidence par dosages biologiques et par dosages radiorécepteurs. L'oCS stimule la croissance de rats hypophysectomisés et est probablement impliquée dans la croissance foetale du Mouton. Des tests histologiques et biochimiques (synthèses de lactose, de caséines, d'ARN messagers des caséines) in vitro et in vivo démontrent que l'oCS stimule à la fois la mammogenèse et la lactogenèse chez la Brebis. L'influence d'hormones variées sur la croissance foetale, la croissance mammaire et l'induction de la lactation est discutée. La localisation de l'oCS a été étudiée par une méthode d'immunofluorescence. L'oCS est localisé dans de grandes cellules de l'épithélium monostratifié des villosités choriales. Ces cellules sont mono ou binucléées et présentent la coloration PAS-positive. La production d'oCS a été déterminée dans les sangs maternel et foetal et dans les liquides amniotique et allantoïdien. La régulation de la sécrétion d'oCS suggère que la biosynthèse d'oCS peut dépendre d'un contrôle endocrinien.

Le rôle de l'oCS dans le maintien du corps jaune de gestation chez la Brebis a été aussi recherché. Comme la prolactine et l'hCS, l'oCS inhibe le catabolisme de la progestérone en 20α -OH progestérone, in vitro. Bien qu'elle soit sécrétée très précocement, l'oCS n'est pas le signal embryonnaire de la gestation, qui semble plutôt être représenté par une protéine trophoblastique antilutéolytique appelée la trophoblastine.

Ainsi, l'oCS présente une activité phéiotypique. Elle semble être active à la fois sur la croissance du foetus et de la glande mammaire, sur le maintien du corps jaune gestatif et elle pourrait être impliquée dans plusieurs métabolismes.

Abstract: An ovine Placental Lactogen (oPL) or ovine Chorionic Somatomammotrophin (oCS) was isolated and characterized. This hormone was purified about 1000 fold. It is contaminated neither by prolactin (PRL) nor by growth hormone (GH). Its activity is equivalent to 20 i.u./mg of N.I.H. ovine prolactin standard and about 0.8 i.u./mg of N.I.H. bovine growth hormone standard. Apparent molecular weight of oCS is about 20,000-22,000 daltons and its isoelectric point is about 7.2. The purified oCS shows no immunological cross-reaction with ovine prolactin, human and ovine growth hormones and human placental lactogen. By means of affinity chromatography on specific receptors, the bifunctional structure of oCS molecule was demonstrated. The lactogenic and growth hormone properties of oCS were evidenced by radioreceptor and biological assays. oCS stimulates the growth of hypophysectomized rats and is probably implicated in ovine foetal growth. Histological and biochemical assays (lactose, casein, casein mRNA syntheses) in vitro and in vivo demonstrates that oCS stimulates both mammarygenesis and lactogenesis in sheep. The influence of various hormones on foetal growth, mammary growth and induction of lactation has been discussed.

The localization of oCS was studied using the immunofluorescence method. oCS was located in large cells of the monolayered epithelium of chorionic villi. These cells are mono or binucleated and PAS-positive.

The production of oCS was determined in maternal and foetal blood and in amniotic and allantoic fluids. The regulation of oCS secretion suggests that oCS biosynthesis may depend on some kind of endocrine control.

The role of oCS in the maintenance of the corpus luteum of pregnancy in sheep has also been investigated. Like prolactin and hCS, oCS inhibits progesterone catabolism to 20α -OH progesterone, in vitro. oCS is not the embryonic signal of pregnancy which seems to be a trophoblastic protein called trophoblastin.

Thus, oCS exhibits a pleiotypic activity. It seems to be active both in the growth of foetus and the mammary gland, in the maintenance of the corpus luteum of pregnancy and might be implicated in several metabolisms.

SOMMAIRE

NOMENCLATURE

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION : ETUDE COMPARÉE DES HORMONES LACTOGÈNES PLACENTAIRES

1. Purification de l'hPL (human Placental Lactogen)
2. Terminologie
3. Purification des autres hormones lactogènes placentaires :
 - a) mCS (monkey CS)
 - b) oCS (ovine CS)
 - c) bCS (bovine CS)
 - d) cCS (caprine CS)
 - e) rCM (rat CM)
 - f) l'hormone lactogène placentaire de Lapine existe-t-elle ? (rCS : rabbit CS)
4. Répartition des hormones lactogènes placentaires selon les espèces

1ère PARTIE

Chapitre I : PURIFICATION DE L'HORMONE LACTOGÈNE PLACENTAIRE OVINE

A. METHODES :

I. Méthodes préparatives

1. Prélèvement des placentas
2. Extraction
3. Précipitations
4. Chromatographie sur DEAE Séphadex
5. Filtrations moléculaires sur gel
6. Chromatographie sur CM Séphadex

II. Méthodes analytiques

1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide
2. Dosage radiorécepteur de l'activité lactogène
 - a) Principe
 - b) Technique
 - 1) Animaux
 - 2) Préparation des membranes
 - 3) Protocole expérimental
 - 4) Caractéristiques du dosage
3. Dosage radiorécepteur de l'activité de croissance
 - a) Principe
 - b) Technique
 - 1) Animaux
 - 2) Préparation des membranes
 - 3) Radioiodation
 - 4) Choix des fractions radioactives de bGH
 - 5) Protocole expérimental et caractéristiques du dosage
4. Dosage radioimmunologique de la prolactine ovine
5. Dosage radioimmunologique de l'hormone de croissance ovine

B. RESULTATS

C. DISCUSSION

Chapitre II : CARACTERE BICEPHALE DE L'oCS

Introduction

METHODE de chromatographie d'affinité sur membranes cellulaires de tissu mammaire

- a) Principe
- b) Technique
 - 1) Radioiodation de l'oCS
 - 2) Purification de l'oCS^{*} sur Ultrogel
 - 3) Test d'activité biologique des fractions d'oCS^{*}

- 4) Chromatographie d'affinité proprement dite sur tissu mammaire
- 5) Elution de l'oCS* avec du $MgCl_2$ (4 M)
- 6) Elimination du $MgCl_2$
- 7) Tests d'activité de l'oCS* éluee

RESULTATS

DISCUSSION

Chapitre III : PRINCIPALES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DE L'oCS

Introduction

METHODES

A. Détermination du Poids Moléculaire (P.M.) de l'oCS

1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS

Principe

Technique

- a) Préparation des solutions protéiques
- b) Préparation des gels
- c) Dépôt des échantillons
- d) Migration des échantillons
- e) Coloration et décoloration

2. Chromatographie d'exclusion moléculaire

Principe

Technique

B. Comportement électrophorétique de l'oCS

Principe

Technique

- a) Préparation des gels
- b) Electrophorèse
- c) Coloration et décoloration
- d) Expression des résultats

C. Détermination du point isoélectrique de l'oCS

Principe

Technique

1. Colonne d'électrofocalisation
2. Solutions d'électrodes
3. Gradient de densité
4. Echantillons d'oCS
5. Remplissage de la colonne
6. Gradient de pH
7. Vidange de la colonne
8. Détermination des pI et localisation de l'oCS

RESULTATS

1. Poids et taille moléculaire de l'oCS
2. Comportement électrophorétique de l'oCS
3. Point isoélectrique apparent de l'oCS

DISCUSSION

Chapitre IV : PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES DE l'oCS

METHODES

1. Immunodiffusion en gel d'agarose

Principe

Technique

- 1) Obtention du gel
 - 2) Préparation des lames
 - 3) Antigènes éprouvés
 - 4) Immunsérums
 - 5) Immunodiffusion
 - 6) Coloration
2. Dosage radioimmunologique de l'hormone de croissance ovine

Principe

Technique

- 1) Immunsérum anti-oGH
- 2) Immunsérum de Lapin anti- γ globuline de cobaye
- 3) Conditions d'incubation
- 4) Caractéristiques de la technique de dosage

3. Dosage radioimmunologique de la prolactine ovine
4. Immunofluorescence

RESULTATS

DISCUSSION

Chapitre V : STRUCTURE DES HORMONES LACTOGENES PLACENTAIRES

1. Comparaison directe des structures primaires des molécules d'hCS, de prolactines et d'hormones de croissance
2. Comparaison des homologies externes des structures primaires des molécules d'hCS, de prolactines et d'hormones de croissance
 - a) Comparaison des homologies de l'hCS et de l'hGH
 - b) Comparaison des homologies de l'hCS et de l'hPRL
 - c) Comparaison des homologies de l'hCS et de l'oGH
3. Evolution moléculaire des hormones lactogènes placentaires
4. Relation structure-fonctions des molécules d'hormones lactogènes placentaires
 - a) Rôle des ponts S-S
 - b) Localisation de l'activité de croissance
 - c) Localisation des activités métaboliques
 - d) Localisation de l'activité lactogène
 - e) Localisation des déterminants antigéniques

2ème PARTIE

Chapitre VI : LIEU DE SYNTHÈSE DE l'oCS :

Introduction

METHODE :

1. Echantillons de tissus
2. Purification de l'oCS
3. Immunsérum anti-oCS
4. Immunsérums témoins
5. Réactions immunocytologiques
6. Critère de spécificité de la réaction immuno-
cytologique
7. Cytologie

RESULTATS

DISCUSSION

Chapitre VII : PRODUCTION ET REGULATION DE LA SECRETION D'oCS

Introduction

MATERIELS ET METHODES :

1. Animaux
2. Prélèvements
3. Extraction de l'oCS
4. Incubation de sérums de brebis
5. Détermination du volume plasmatique
6. Taux de production de l'oCS

RESULTATS

1. Evolution des taux sériques d'oCS maternelle
2. Diagnostic de gestation par dosage de l'oCS maternelle
3. Comparaison des concentrations des activités lactogène et somatotrope de l'oCS chez la mère, chez le foetus et dans les liquides amniotique et allantoïdien
4. Taux de production de l'oCS
5. Croissance du placenta et synthèse d'oCS
6. Production d'oCS et gémellité
7. Diagnostic de gémellité
8. Régulation de la sécrétion d'oCS

Chapitre VIII : oCS ET CONTROLE DE LA CROISSANCE FOETALE

Introduction

MATERIELS ET METHODE :

1. Animaux
2. Prélèvements
3. Tests d'activité de croissance
4. Tests d'activité somatomédine

RESULTATS :

1. Activité de croissance de l'oCS
 - a) oCS et croissance osseuse
 - b) oCS et croissance pondérale
 - c) Liaison de l'oCS aux récepteurs de l'hormone de croissance
2. Relation entre la production d'oCS et la croissance foetale
 - a) Production d'oCS au cours des stades précoces de la croissance foetale chez la Brebis
 - b) Analyse des courbes de croissance pondérale du foetus d'agneau

- c) Evolution de la concentration d'activité de croissance foetale (oCS + oGH) chez le foetus d'agneau
- d) Proportionnalité entre le poids foetal et la quantité totale d'activité de croissance (oCS + oGH) présentée par le foetus
- e) Ralentissement de la croissance foetale et activité des hormones de croissance circulante

- 3. Ontogénèse de la somatomédine A et croissance foetale
- 4. Croissance foetale et prolactine
- 5. Croissance foetale et lactation induite

DISCUSSION

Chapitre IX : ACTIVITES METABOLIQUES PROBABLES DE L'oCS

Introduction

- 1. Métabolisme glucidique et oCS
- 2. Métabolisme lipidique et oCS
- 3. oCS et pathogénie de la toxémie de gestation de la Brebis
- 5. Anabolisme protéique et oCS

Chapitre X : oCS ET GLANDE MAMMAIRE

Introduction

MATERIELS ET METHODES :

- 1. Animaux
- 2. Préparations d'hormone lactogène placentaire
- 3. Dosage radiorécepteur de l'activité lactogène
- 4. Technique de culture du tissu mammaire
- 5. Examen histologique
- 6. Dosage des acides nucléiques de la glande mammaire de Brebis

7. Dosage des activités lactose synthétase et galactosyltransférase
8. Mise en évidence de la synthèse de caséine in vitro
9. Quantification des ARN messagers des caséines

RESULTATS

1. oCS et mammogénèse
2. oCS et lactogénèse de gestation
3. oCS et capacité d'induction d'une production laitière pendant la gestation
4. Interrelations endocriniennes dans la régulation de l'expression des gènes des caséines chez la Brebis

DISCUSSION

Chapitre XI : oCS ET MAINTIEN DU CORPS JAUNE GESTATIF

Introduction

MATERIELS ET METHODES :

1. Animaux
2. Matériels injectés par voie intrautérine aux brebis receveuses
3. Dosage radioimmunologique de la progestérone
4. Dosage radioimmunologique de la 20α -OH-Progestérone
5. Périfusion
6. Incubation
7. Détermination de l'activité 20α -OH-stéroïde déshydrogénase
8. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide

RESULTATS :

1. Activité lutéotrophique de l'oCS in vitro
2. oCS et maintien du corps jaune gestatif chez la Brebis hypoprolactinémique
3. Mise en évidence d'une activité gonadotrophique chorionique chez la Brebis

4. L'OCS n'est pas le facteur de signal embryonnaire de la gestation : mise en évidence de la trophoblastine
- a) Inhibition de la lutéolyse cyclique par des homogénats totaux de trophoblastes
 - b) Nature de la substance antilutéolytique
 - c) Durée de la synthèse de la trophoblastine
 - d) Persistance de l'action de la trophoblastine sur la lutéolyse cyclique
 - e) Analyse comparative préliminaire des profils électrophorétiques des liquides utérins et des divers constituants trophoblastiques

DISCUSSION

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

BIBLIOGRAPHIE

NOMENCLATURE
COURAMMENT UTILISEE

OPL = OCS	:	Ovine Placental Lactogen = Ovine Chorionic Somatomammotrophin
STH = GH	:	Hormone somatotrope ou hormone de croissance (Growth Hormone)
HGH	:	Human Growth Hormone
HPL = HCS	:	Human Placental Lactogen = Human Chorionic Somatomammotrophin
HCG	:	Human Chorionic Gonadotrophin
PMSG	:	Pregnant Mare Serum Gonadotrophin
GH - IF	:	GH - Inhibiting Factor = Somatostatine
RF	:	Releasing Factor
PAS +	:	Coloration à l'acide périodique - Schiff positive
Bromocryptine:		2-bromo- α -ergocryptine = CB 154 Sandoz

Pour éviter toute confusion, nous adopterons les définitions suivantes :

Lactogénèse: Synthèse de lactose (et non de lait)

Montée
laiteuse : Synthèse de lait

Galactopoïèse: Entretien de la sécrétion lactée

P : Publication

C : Communication

x : présente en annexe dans le manuscrit d'origine

AVANT-PROPOS

En 1967, dans le cadre d'une thèse de Doctorat Vétérinaire (Publication P₁), nous réalisions une étude bibliographique comparée des hormones lactogènes placentaires, en analysant tout particulièrement l'hormone humaine qui était la seule bien connue.

A notre entrée à l'I.N.R.A. dans le Laboratoire de Physiologie de la Lactation, le Directeur, Robert DENAMUR^{*}, nous chargea d'essayer de résoudre les problèmes techniques posés par la mise au point d'un test quantitatif in vitro de la lactogénèse chez la Lapine. En effet, cette espèce constitue un modèle simple d'Endocrinologie de la Lactation. Les résultats de ces travaux (MARTAL, 1970, P₂) sont à la base de l'évaluation de la biosynthèse du lactose, in vitro, employée actuellement encore régulièrement (MARTAL & coll., 1975, 1976, Communications C_{9x}, C₁₁).

Nous nous sommes intéressés ensuite à caractériser les conditions de la sécrétion d'une hormone galactopoïétique, l'hormone somatotrope hypophysaire (MARTAL 1972, P₃, P₄, 1973, P₅, 1975, P₆, P₇). Cette hormone avait été identifiée par DENAMUR (1964) comme faisant partie du complexe hormonal lactogène minimum chez les Ruminants (prolactine, cortisol, hormone de croissance). A notre grande surprise, d'après nos dosages radioimmunologiques, l'hormone somatotrope ne présentait pas d'augmentation de concentrations sériques (MARTAL, 1973, P₅, 1978, P_{18x}) au cours de l'apparition du lactose dans la glande mammaire de la Brebis, vers le 95-100ème jour de gestation (DENAMUR, 1964).

^{*}Décédé le 25 avril 1973

Par analogie avec l'hormone lactogène placentaire humaine, ces résultats nous incitèrent à postuler l'existence d'une (ou des) hormone(s) placentaire(s) susceptible(s) de posséder les propriétés de la prolactine et de l'hormone de croissance. L'hypophysectomie de la Brebis gestante (DENAMUR & MARTINET, 1961) qui provoque une involution mammaire beaucoup plus faible que chez la Brebis en lactation, avait déjà suggéré un rôle endocrinien du placenta au niveau de la croissance mammaire (MARTAL, 1967, P₁).

INTRODUCTION

Etude comparée des hormones
lactogènes placentaires

Le placenta est connu depuis longtemps comme glande endocrine en raison de ses sécrétions de progestérone, d'oestrogènes ou de gonadotrophine chorionique dont les modalités varient considérablement selon les espèces (TURNER, 1963).

Jusqu'en 1960, le ou les facteurs placentaires de lactation et de croissance étaient fort mal connus. Sans faire un long historique, signalons que de nombreuses expériences entre 1933 et 1945 chez la Ratte et la Souris gestantes suggéraient l'existence d'une substance lactogène placentaire. En 1955, RAY, AVERILL, LYONS et JOHNSON étudient méthodiquement l'action du placenta sur le jabot de Pigeon, la glande mammaire et l'ovaire de Ratte. CERRUTI & LYONS (1960) démontrent chez la Souris le rôle mammotrophique des extraits placentaires en même temps que leur rôle lutéotrophique. En 1961, KUROSAKI montre l'activité lactogène de placentas humains chez des Lapines et chez des Femmes venant d'accoucher. En injectant des doses variées de plasma de Rattes gestantes à des Rattes hypophysectomisées, CONTOPOULOS & SIMPSON (1957) observent une augmentation du thymus, des cartilages de conjugaison des épiphyses tibiales et du poids du corps des animaux. FUKUSHIMA (1961) observe également l'efficacité d'extraits placentaires humains sur la croissance osseuse du tibia de Rat.

1. Purification de l'hormone lactogène placentaire
(human Placental Lactogen, hPL ou human Chorionic Somatomotropin, hCS)

Les premiers essais de purification de la "prolactine placentaire" furent réalisés par HIGASHI (1961, 1962) et ITO & HIGASHI (1962) à partir de placentas humains. En 1962, JOSIMOVICH et MAC LAREN réussissent la purification partielle d'une substance hautement lactogène, à activité somatotrope, et immunologiquement reliée à l'hormone de croissance hypophysaire. Ils emploient une méthode utilisée par LI pour l'isolement de l'hormone de croissance hypophysaire.

Après une extraction à pH 8,6, une précipitation à pH 4,5, puis une autre précipitation par le sulfate d'ammonium à 50% de saturation, ils effectuent une chromatographie sur colonne d'Amberlite CG50. Précipitée à l'éthanol (20%), une fraction contient environ 12% d'activité de croissance correspondant à celle de la bGH(N.I.H.) mais peu d'activité lactogène. En revanche, une autre fraction précipitée à pH 3,9, renferme une activité égale à 50% de celle de la prolactine ovine (N.I.H.) dans le test du jabot de Pigeon, et conserve près de 5% de l'activité de la bGH. En fait, l'activité lactogène de la préparation reste faible puisqu'elle ne correspond qu'au 1/4 de l'activité de la prolactine ovine quand elle est injectée à des Lapines en pseudogestation. La fraction pH 3,9 paraît partiellement dégradée et est encore assez hétérogène. En 1964, COHEN, GRUMBACH et KAPLAN obtiennent une préparation homogène et plus active. Après une extraction alcaline à pH 10, dans du KCl (0,3M), et une précipitation par le sulfate d'ammonium, le matériel actif est passé sur une colonne de DEAE cellulose puis filtré sur gel Séphadex G 75. Un dosage radioimmunologique de l'hPL peut être mis au point et les conditions de sécrétion de l'hormone sont étudiées (KAPLAN & GRUMBACH, 1965).

La préparation de FRIESEN (1965) est obtenue après une extraction alcaline, une précipitation à pH 4,5, une précipitation par le sulfate d'ammonium comme celle de JOSIMOVICH et MAC LAREN, mais complétée par une filtration sur Séphadex G 100. Après électrophorèse sur gel d'amidon, FRIESEN observe une seule protéine qui présente une réaction immunologique croisée avec l'hGH. Bien qu'ayant émis, à la suite des travaux de JOSIMOVICH et MAC LAREN, l'hypothèse de l'existence de deux substances, l'une à activité lactogène, l'autre à activité d'hormone de croissance, FRIESEN pense alors qu'il ne s'agit que d'une seule et même hormone.

A partir d'une grande quantité de placentas humains collectés par les Laboratoires LEDERLE, FLORINI & coll. (1966) parviennent à la même conclusion que FRIESEN en obtenant une protéine hautement purifiée (à 95%) à la suite d'une chromatographie sur DEAE cellulose et d'une double filtration sur Séphadex G100.

En comparant l'activité immunologique des meilleures préparations d'hPL (human Placental Lactogen) à leur disposition, par rapport à leur propre préparation prise comme standard, GRUMBACH & coll. (1968) déterminent une activité de 150% pour la préparation d'hPL de FLORINI (Laboratoire LEDERLE) et de 100% pour celle de FRIESEN. L'activité de divers lots variait néanmoins de 2 à 100%. TURTLE, BECK & DAUGHADAY (1966) préparent aussi l'hPL par chromatographie sur DEAE cellulose et filtration sur gel Séphadex G 200. CATT & coll. (1967) préparent à leur tour cette hormone pour établir les analogies structurales entre l'hPL et l'hGH. L'hPL est encore purifiée par divers auteurs notamment BOLLENGIER & HUBINONT (1968), KUMAI (1970), STEPANOVA (1973), etc... En 1978, une préparation

Tableau I

Activités de croissance comparées des hormones lactogènes placentaires

ESPECES	SERUM*		PLACENTA*		PREPARATIONS		AUTEURS
	ng Eq. GH/ml	GH/PRL	µg Eq. GH/g	T.F.	oPRL*Eq. U.I./mg	oGH*Eq. U.I./mg	
Femme (hCS)	200	0,04	5		6,25 24	0,005 0,004	ROBERTSON & FRIESEN (1975) KAPLAN & GRUMBACH (1964) FORSYTH (1967)
Singe (mCS)	45 000	1	100		1,7 -	0,13 0,01 0,1	JOSIMOVICH & coll. (1968) LI (1972) TSUSHIMA & FRIESEN (1973) SHOME & FRIESEN (1971)
Brebis (oCS)	700 350	0,3 0,6	200 60		26 20 7	1,3 0,8 0,2	CHAN & coll. (1976) MARTAL & DJIANE (1975, 1977) HANDWERGER & coll. (1974) BECKA & coll. (1977)
Chèvre (oCS)	1 200	1	55				
Vache (bCS)	350	0,7	50		0,03	0,0006	BOLANDER & FELLOWS (1976)
Ratte	0	-	0		10	0	ROBERTSON & FRIESEN (1975)
Cobaye	1 500	0,6	1		-	-	BOLANDER & FELLOWS (1976)
Lapine	0	-	0		0,0006mg (rPRL Eq)	0,0007mg (rGH Eq)	

*d'après les concentrations maximales obtenues par KELLY & coll. (1976) (Les valeurs sont en général 2-3 fois supérieures à celles de MARTAL & DJIANE).

N.B.: Les valeurs considérées nulles par dosage radiorécepteur correspondent, soit aux niveaux de la GH hypophysaire, soit à des interférences non spécifiques, soit encore à des valeurs trop faibles pour être jugées significatives (<5 ng/ml).

• Hormones de références : Prolactine ovine (N.I.H. PS 24 U.I./mg), hormone de croissance ovine (oGH N.I.H. 1 U.I./mg).

standard internationale vient d'être enfin établie pour les tests immunologiques d'hormone lactogène placentaire humaine, chaque ampoule contient 850 μ g correspondant à 850 μ U.I. (COTES & DAS).

On comprend toute la prudence nécessaire à l'interprétation de dosages radioimmunologiques différents s'appuyant sur des standards variant notamment avec l'origine de la préparation, du lot et du mode de conservation.

2. Terminologie

Au cours des diverses purifications d'hormone lactogène placentaire humaine, la plupart des auteurs appliquèrent leur propre dénomination.

ITO et HIGASHI parlèrent de "substance placentaire analogue à la prolactine", JOSIMOVICH et MAC LAREN proposèrent le terme d'hPL (human Placental Lactogen), COHEN & coll. isolèrent une substance chorionique ressemblant à la prolactine et à l'hormone de croissance (CGP : Chorionic Growth Hormone - Prolactin). FRIESEN insista sur la notion de "protéine placentaire" et FLORINI & coll. de "protéine placentaire purifiée" : PPP (H) : Purified Placental Protein (Human). En 1967, (P_1), nous avons simplifié la nomenclature en désignant cette hormone sous le nom de "prolactine placentaire". Mais en 1968, LI, GRUMBACH, KAPLAN, JOSIMOVICH, FRIESEN et CATT proposèrent une terminologie commune rassemblant les principales propriétés de cette hormone : la Somatomammotrophine Chorionique Humaine ou hCS. Actuellement, la Commission de nomenclature biochimique internationale recommande le terme de "Chorionic Somatomammotropin (CS) (1975)*.

* Biochimica et Biophysica Acta (1975) 404, 152-155.

Malheureusement, ce terme est lourd, et d'un emploi souvent incommode. De plus, il est parfois inexact quand il s'agit d'une hormone dépourvue d'activité somatotrope. Son emploi peut être imprudent lorsque l'on met en évidence l'activité lactogène d'une nouvelle hormone placentaire sans connaître encore son activité de croissance potentielle.

Enfin, même pour l'hormone lactogène placentaire humaine, ce terme est discutable au regard de la très faible activité de croissance (tableau I). Ces raisons expliquent que bon nombre de Cliniciens et de Chercheurs évitent d'utiliser cette terminologie internationale, et préfèrent souvent le terme d'hPL (human Placental Lactogen).

Pour notre part, après avoir prudemment utilisé le terme d'oPL chez la Brebis (ovine Placental Lactogen) (MARTAL & DJIANE, 1975, MARTAL & coll., 1975, 1976, 1977, P_{8x}, C_{9x}, C₁₁, P_{16x}), nous avons proposé quand l'activité de croissance fut démontrée, le terme d'oCS (MARTAL & DJIANE, 1977, P_{14x}), plus conforme à la nomenclature internationale. En réalité, les deux termes PL et CS continuent à être employés indifféremment, mais il nous semble préférable d'utiliser l'abréviation CS lors des études des propriétés somatotropes de l'hormone ou lors des études structurales.

Chez la Ratte, l'hormone lactogène placentaire, qui ne possède pas d'activité de croissance, est désignée par l'abréviation rCM (rat Chorionic Mammotropin) ou rPL.

Il convient de noter que le terme de PL n'est pas non plus entièrement satisfaisant car, dans des conditions physiologiques normales, les hormones placentaires sont mammogènes et non pas lactogènes, dans le sens courant de production de lait.

Enfin, la nomenclature internationale recommande encore d'employer les suffixes "tropin" de préférence à "trophin" car les tests biologiques sont basés le plus souvent sur des effets autres que trophiques. Néanmoins, pour des raisons d'euphonie, nous conservons de préférence l'ancienne terminologie en langue française (MARTAL, 1978, P_{18x}).

3. Purification des autres hormones lactogènes placentaires

a) Purification de la mCS (monkey Chorionic Somatomammotropin).

A la suite des observations de réactions immunologiques croisées entre les extraits placentaires de Singe, GRUMBACH, 1964), il était intéressant d'isoler et de caractériser la Somatomammotrophine de Singe. Malgré les difficultés pour obtenir des placentas de Singe en quantité suffisante, SHOME & FRIESEN (1971), puis VINIK, GRUMBACH & KAPLAN (1973) réalisèrent la purification de la mCS. Les premiers utilisèrent comme test biologique l'activité de croissance de l'hormone dans le test du tibia, alors que les seconds se contentèrent de critères immunologiques et d'une préparation de mCS des premiers, comme référence.

Les principales étapes de purification utilisées par SHOME et FRIESEN sont une filtration sur Séphadex G 100, et une double chromatographie sur CM cellulose puis sur DEAE cellulose, alors que VINIK & coll. emploient notamment des précipitations alcooliques, une filtration sur Séphadex G 100 et une chromatographie sur DEAE cellulose. Seule l'activité de croissance de la mCS a été testée, elle est égale à environ 0,1 U.I./mg (Tableau I).

b) Purification de l'oCS (ovine Chorionic Somatomammotropin). FORSYTH (1971, 1973) démontra directement par coculture de placenta et de glande mammaire, la présence d'une hormone lactogène placentaire chez la Brebis, et KELLY, ROBERTSON & FRIESEN (1974) montrèrent sa présence dans le sang par dosage radiorécepteur. Ces deux résultats furent confirmés par DJIANE & KANN (1975).

La purification de l'oCS fut entreprise indépendamment par trois groupes : HANDWERGER, MAURER, GARRET, HURLEY & FELLOWS (1974), MARTAL & DJIANE (1975, P_{8x}), CHAN, ROBERTSON & FRIESEN (1976). Les techniques, quoique différentes dans le détail, sont assez proches : extraction alcaline (CHAN, MARTAL) ou neutre (FELLOWS), précipitation à pH 4,5 (MARTAL), précipitation par le sulfate d'ammonium, filtration sur Séphadex ou Ultrogel, chromatographie sur échangeurs d'anions (DEAE cellulose, CHAN, FELLOWS, DEAE Séphadex MARTAL) et de cations (CM cellulose CHAN, FELLOWS, CM Séphadex, MARTAL). La préparation d'oCS de CHAN est presque aussi puissante que l'hGH en terme de radiorécepteur; alors que la préparation d'oCS d'HANDWERGER correspond au 1/5 de l'activité de l'oGH en dosage

radiorécepteur, celle de MARTAL est presque aussi puissante que celle de CHAN pour les activités GH et PRL, d'après BLANK, CHAN & FRIESEN (1977) (Tableau I).

c) Purification de la bCS (bovine Chorionic Somatomammotropin). Identifiée par FORSYTH & BUTTLE (1972) et FORSYTH (1973), au moyen de coculture de placenta et de glande mammaire, la sécrétion de bCS est déterminée dans le sérum, à des stades gestatifs variés, par un test semi-quantitatif d'activité lactogène (BUTTLE & FORSYTH, 1976), par dosage radiorécepteur (KELLY & coll., 1974, 1976, DJIANE & coll., 1975, C_{10x}, voir revue MARTAL, 1979, P₂₅) et par radioimmunologie (BOLANDER & coll., 1976). Si la concentration sérique de la bCS est faible, sa concentration placentaire est **par** contre importante (Tableau I).

La purification de la bCS a été réalisée par le groupe de biochimistes structuralistes de FELLOWS (FELLOWS & coll., 1976, BOLANDER & FELLOWS, 1976 a,b), au moyen d'une méthode comparable aux précédentes. Les auteurs rapportent un pourcentage d'homogénéité de 99%, mais le facteur de purification n'est que de 40 fois, ce qui est tout à fait surprenant comme le soulignent BLANK, CHAN & FRIESEN (1977), au regard des facteurs de purification de l'ordre de 1000, rapportés par les trois groupes pour l'oCS, et alors que les concentrations placentaires de bCS et d'oCS sont du même ordre de grandeur (Tableau I). Bien que BOLANDER & FELLOWS (1976) considèrent que l'inactivation de leur préparation de bCS paraisse improbable, puisqu'ils obtiennent une préparation d'oCS très active

par un procédé identique, ils ignorent la cause des très basses activités de leur préparation. En fait, l'activité protéasique peut varier considérablement entre les placentas de plusieurs espèces ou de plusieurs individus. Il serait intéressant de comparer les résultats précédents à celui d'autres groupes.

d) Purification de la cCS (caprine Chorionic Somatomammotropin). L'hormone lactogène placentaire de Chèvre a été d'abord identifiée par culture de placenta de Chèvre à différents stades de gestation en présence de glande mammaire de Souris (BUTTLE, FORSYTH & KNAGGS, 1972, FORSYTH, 1972, 1973). Ces résultats furent confirmés et étendus par SKARDA & coll. (1974), KELLY & coll. (1976) et CURRIE & coll. (1977).

La Somatomammotrophine de Chèvre a été purifiée et caractérisée par BECKA & coll. (1977) et CURRIE & coll. (1977). D'après ces auteurs, leur préparation de cCS est presque identique à l'oCS en activité lactogène et en activité d'hormone de croissance. La similarité entre ces deux hormones est probablement la conséquence de la proximité phylogénique entre la Chèvre et la Brebis.

e) Purification de la rCM (rat Chorionic Mammotropin). Ce terme a été proposé par LYONS en 1958. L'hormone n'a été purifiée et partiellement caractérisée que récemment (ROBERTSON & FRIESEN, 1975, KELLY, ROBERTSON & FRIESEN, 1975, YANAI, MORI & NAGASAWA, 1977).

Bien que les activités mammothrophiques et lactogènes de la rCM aient été abondamment confirmées par des tests biologiques in vivo (MATTIES, 1967, 1968, COHEN & GALA, 1969, SHANI & coll., 1970) et in vitro (TALAMANTES, 1975) et par dosage radiorécepteur (SHIU & coll., 1973, KELLY & coll., 1976), l'activité d'hormone de croissance n'a pu être mise en évidence ni par dosage radiorécepteur du sérum et des extraits placentaires (KELLY & coll., 1976), ni à partir de préparation d'hormone lactogène placentaire purifiée (ROBERTSON & FRIESEN, 1975).

La rCM de ROBERTSON a été purifiée plus de 1 300 fois. Une étape de focalisation isoélectrique est introduite dans la purification à côté de la précipitation par le sulfate d'ammonium, de la chromatographie sur échangeurs d'ions et de la filtration sur gel Séphadex G 100. Les auteurs partirent de 160 g de placentas provenant de 50 à 60 Rattes gestantes, et obtinrent quelques mg de rCM. On comprend que, dans ces conditions, la rCM soit encore insuffisamment connue. L'activité de la préparation de ROBERTSON & FRIESEN est égale à environ 10 U.I./mg de prolactine, estimation par dosages radiorécepteurs par rapport à une prolactine ovine standard (25 U.I./mg) et une hCS standard de N.I.H. (17 U.I./mg d'activité prolactinique). Elle est dépourvue d'activité somatotrope d'après un dosage radiorécepteur sur membranes de foie (Tableau I).

f) L'hormone lactogène placentaire de Lapine existe-t-elle ? (rCS : rabbit Chorionic Somatomammotropin). La purification et la caractérisation de cette hormone a été effectuée par BOLANDER & FELLOWS (1976 c). D'après ces auteurs, l'hormone est purifiée à plus de 90% d'homogénéité, sa mobilité électrophorétique, son point isoélectrique, son poids moléculaire, et même sa composition en acides aminés ont été déterminés. La méthode de purification est tout à fait classique, bien qu'aucun test d'activité biologique n'ait été réalisé, et que le facteur de purification n'est que de 40 fois. Aucun test immunologique n'a pu être utilisé car la protéine isolée ne croise avec aucune hormone examinée (GH de Lapine, prolactine de Rat et bCS). Néanmoins, deux dosages radiorécepteurs ont été effectués, mais 1 mg du produit isolé présente une activité dérisoire : il correspond à 0,0006 mg de prolactine et 0,0007 mg d'hormone de croissance de Rat, d'après les auteurs eux-mêmes.

Lorsque du placenta de Lapine est cultivé avec du tissu mammaire de Souris (FORSYTH, 1974, TALAMANTES, 1975) ou même de Lapine (FORSYTH, 1974) aucune activité lactogène n'est détectable histologiquement, alors que cette méthode est très sensible même chez la Vache qui possède des niveaux de bCS particulièrement faibles (BUTTLE & FORSYTH, 1976). En effet, si l'aspect quantitatif de ces tests in vitro est discutable, leur aspect qualitatif l'est beaucoup moins. De plus, ainsi cultivés, les explants de placentas sont de véritables petites usines à hormone et la coculture de glande mammaire apporte toute la spécificité du test.

Enfin, par dosage radiorécepteur, KELLY & coll. (1973, 1976) et DURAND & DJIANE (1977) ne parviennent pas à mettre en évidence d'activité lactogène d'origine placentaire, considérant que les niveaux observés de 20-25 ng/ml ne proviennent que de la prolactine hypophysaire. L'activité somatotrope totale obtenue par KELLY & coll. (1976) est étonnante (200 ng/ml), car elle est huit fois plus puissante que l'activité lactogène, ce qui serait tout à fait extraordinaire par comparaison au rapport d'activité des autres hormones lactogènes placentaires (tableau I). Les auteurs pensent d'ailleurs que les niveaux seraient plutôt dus, d'une part, à l'hormone de croissance hypophysaire, et d'autre part, à des interférences non-spécifiques, d'autant que les extraits placentaires ne présentent pas d'activité significative. Soulignons, en effet, que les concentrations salines ou protéiques élevées inhibent très souvent la liaison d'une hormone radioactive à ses récepteurs membranaires. De plus, les valeurs de dosage radiorécepteur de KELLY sont en général nettement supérieures à celles de DJIANE ou de MARTAL. Sans doute faut-il chercher la source de ces différences, soit dans la différence des standards, soit dans la portion de la courbe étalon qui sert de référence. Enfin, chez la Lapine, il est évidemment impossible d'affirmer que quelques ng/ml d'activité lactogène ou somatotrope ne puissent pas provenir d'une hormone placentaire. C'est seulement en ce sens que les résultats d'isolement d'une hormone lactogène placentaire chez la Lapine par BOLANDER & FELLOWS (1976) ne s'opposeraient pas aux résultats négatifs des tests de FORSYTH, TALAMANTES, KELLY, DURAND & DJIANE.

Il reste qu'une telle hormone, si elle existe, ne paraît guère déterminante dans la physiologie de la gestation chez la Lapine.

Tableau II : Répartition des hormones lactogènes placentaires selon les espèces.

ESPECES	PRESENCE	ACTIVITE LACTOGENE	ACTIVITE DE CROISSANCE	RADIORECEPTEUR		PURIFICATION	AUTEURS
				PRL	GH		
<u>Primates :</u>							
Femme (hCS)	+	+	+	+	+	+	JOSIMOVICH & MAC LAREN (1962) COHEN & coll. (1964) FRIESEN (1965) FLORINI & coll. (1966) SHOWE & FRIESEN (1971)
Singe (mCS)	+	+	+	+	+	+	
<u>Ruminants :</u>							
Brebis (oCS)	+	+	+	+	+	+	HANDWERGER & coll. (1974) MARTAL & DJIANE (1975) CHAN & coll. (1976) CURRIE & coll. (1977)
Chèvre (cCS)	+	+	+	+	+	+	BECKA & coll. (1977) KELLY & coll. (1976)
Vache (bCS)	+	+	+	+	+	+	BOLANDER & FELLOWS (1976) FORSYTH (1973)
Daim	+	+					
<u>Rongeurs :</u>							
Ratte (rCM)	+	+	-	+	-	+	ROBERTSON & FRIESEN (1975) TALAMANTES (1975)
Souris	+	+	-	+	-		KELLY & coll. (1976) TALAMANTES (1975)
Cobaye	+	+	+	+	+		KELLY & coll. (1976) TALAMANTES (1975)
Chinchilla	+	+					TALAMANTES (1975)
Hamster	+	+	-	+	-		KELLY & coll. (1976) BOLANDER & FELLOWS (1976)
Lapine	±	-	-	-	-	±	TALAMANTES (1975) KELLY & coll. (1976) DURAND & DJIANE (1977)
<u>Carnivores :</u>							
Chienne	-	-		-	-		TALAMANTES (1975) KELLY & coll. (1976)
Chatte	-			-	-		KELLY & coll. (1973) MARTAL & DJIANE (1976)
<u>Suidés :</u>							
Truie	-			-	-		KELLY & coll. (1973), KELLY (1976)

4. Répartition des hormones lactogènes placentaires selon les espèces.

Nous résumons, dans les tableaux I et II, et la figure 1, les principaux résultats actuels. D'après des tests d'activité lactogène in vitro ou des tests radiorécepteurs d'activité lactogène ou somatotrope, certaines espèces ne paraissent pas posséder de Somatomammotrophine chorionique, c'est le cas de la Chienne (TALAMANTES, 1975, KELLY & coll., 1976), de la Chatte (KELLY & coll., 1973, MARTAL & DJIANE, 1976, P₁₃) et de la Truie (KELLY & coll., 1973, KELLY, 1976). Nous avons discuté du cas de la Lapine.

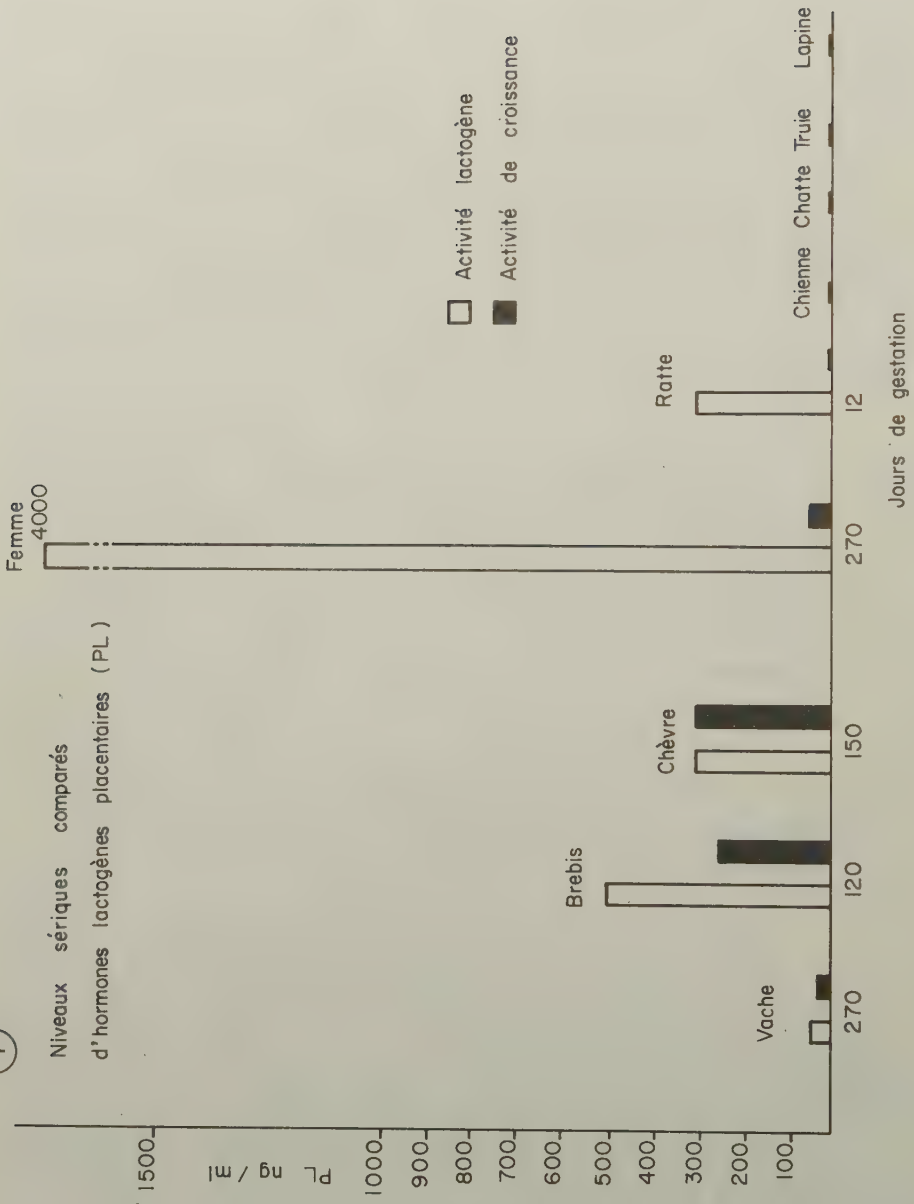
D'autres espèces possèdent une hormone lactogène placentaire à deux fonctions. Mais certaines présentent une hormone lactogène à forte activité de croissance comme c'est le cas du Singe ou des petits Ruminants dont l'hormone a été purifiée, ou du Cobaye dont l'hormone n'a pas été encore isolée.

D'autres espèces comme la Femme présentent une hormone lactogène placentaire à très faible activité de croissance qui est même négligeable ou nulle dans certaines préparations (Tableau I).

Chez la Vache, les activités lactogène et somatotrope circulantes sont souvent faibles (BUTTLE & FORSYTH, 1976, DJIANE & coll., 1975, C_{10x}, MARTAL, 1979, P_{25x}, KELLY & coll., 1973, 1976) et les activités de l'hormone purifiée dérisoires (BOLANDER & FELLOWS, 1976 a). Chez le Daim (FORSYTH, 1973), seule l'activité lactogène a été testée.

1

Niveaux sériques comparés
d'hormones lactogènes placentaires (PL)



Enfin, l'hormone lactogène placentaire d'autres espèces ne semble pas présenter d'activité de croissance significative comme c'est le cas de la Mammothrophine Chorionique de Ratte (ROBERTSON & FRIESEN, 1975, KELLY & coll., 1975, 1976). Ces derniers auteurs ne sont pas parvenus non plus à mettre en évidence une activité significative d'hormone de croissance dans le sérum et le placenta de Souris et de Hamster. Il faut noter que la Souris gestante possède une protéine sérique capable de lier l'hormone de croissance circulante, ce qui peut masquer par défaut l'activité de croissance réelle d'un sérum (PEETERS & FRIESEN, 1977) et ce qui peut aussi interférer dans un dosage radiorécepteur en liant l'hormone radioactive et en entraînant des valeurs anormales, par excès.

Bien que CONTOPOULOS & SIMPSON (1957) aient observé par dosage biologique une importante activité de croissance dans le sérum de Ratte gestante, SCHALCH & REICHLIN (1966) retrouvèrent, par dosage immunologique de l'hormone de croissance de Rat, seulement 1% des concentrations déterminées par les auteurs précédents. Ces résultats peuvent suggérer que cette activité est liée à une protéine de transport analogue à celle de la Souris, ou que l'activité est due à des facteurs plasmatiques de type Somatomédine, par exemple (l'existence d'hormone de croissance placentaire restant pour le moment exclue en raison de l'absence d'activité somatotrope des extraits de placenta) (Tableau I).

Chez ces dernières espèces, l'absence d'hormone de croissance placentaire pose le problème de la croissance presque normale des foetus anencéphales ou décapités (Nous discuterons cet aspect de façon approfondie plus loin).

L'ensemble des hormones lactogènes placentaires recensées permet de voir que la répartition de ces hormones ne suit pas systématiquement la classification zoologique et la phylogenèse.

La présence d'activité d'hormone de croissance parallèlement à l'activité lactogène suggère, soit l'existence d'une hormone à deux fonctions, soit l'existence de deux hormones placentaires. Nous étudierons particulièrement ce problème dans le cas de l'oCS (Chapitre II).

1ère PARTIE

" Si l'approche réductionniste n'a cessé de remporter des succès, elle n'en a pas moins des limites. Dans de nombreux cas, elle est nécessaire mais non suffisante. Selon toute vraisemblance, on verra dans les années à venir se développer en parallèle une autre approche plus intégrative et "organismique" dans l'étude des grands problèmes de la Biologie ".

GROS, JACOB et ROYER, 1979.

CHAPITRE I

Purification de l'hormone

lactogène placentaire ovine

INTRODUCTION

Lorsque nous avons entrepris l'isolement de l'hormone lactogène placentaire chez la Brebis, l'existence d'une telle hormone, depuis longtemps supposée, avait été essentiellement suggérée par les expériences d'hypophysectomie de Brebis gestantes (DENAMUR & MARTINET, 1961) qui présentaient cependant un développement mammaire considérable, et par les données d'endocrinologie comparée (voir revue MARTAL, 1967, P₁). La mise en évidence de l'activité lactogène du placenta de Brebis venait d'être démontrée par FORSYTH (1971, 1973) au moyen de coculture de placenta et de glande mammaire, et confirmée par DJIANE & KANN (1975).

De plus, la présence d'une nouvelle méthode de dosages par radiorécepteur des activités lactogènes (SHIU & coll., 1973) et des activités de croissance (TSUSHIMA & FRIESEN, 1973) puis l'application de ces nouvelles techniques par DJIANE, dans notre laboratoire, nous permettait d'aborder l'isolement de nouvelles hormones placentaires.

A) METHODES

I) METHODES PREPARATIVES

1. Prélèvement des placentas

Les placentas proviennent de Brebis, de race Préalpes du Sud, sacrifiées entre 100 et 120 jours de gestation, au moment où la concentration d'hormone lactogène placentaire est maximale, comme nous le verrons plus loin. Les cotylédons foetaux, nettement plus riches que les cotylédons maternels en hormone lactogène, sont séparés de ceux-ci, soigneusement séchés dans un linge, pesés et congelés dans l'azote liquide, puis conservés à -15°C jusqu'au jour de l'extraction.

2. Extraction

Environ 500g de cotylédons, soit environ deux placentas, sont broyés au maillet dans un linge, puis décongelés dans du tampon phosphate 0,01 M, pH 7,6, contenant du KCl 0,3 M. Toutes les étapes suivantes de purification sont réalisées à la chambre froide ($+ 4^{\circ}\text{C}$). Les placentas décongelés et broyés sont homogénéisés dans le même tampon au moyen d'un homogénéiseur Ultra-Turrax (pendant 30 secondes, à 70% de la vitesse maximum), puis filtrés sur de la gaze, et homogénéisés de nouveau dans un homogénéiseur Potter (5-6 homogénéisations). Après une seconde filtration sur gaze, le filtrat est ajusté à pH 9,5, puis agité sur un agitateur magnétique pendant 4 heures. L'extrait est centrifugé à 12 000 g pendant 30 mn. Le culot est lavé avec le tampon d'extraction et centrifugé de nouveau.

3. Précipitations

Les surnageants sont mélangés, puis ajustés à pH 4,5. Après une nuit de précipitation, ils sont centrifugés (12 000 g, 30 mn), le culot est éliminé, et le surnageant est ajusté à pH 6,9, puis du sulfate d'ammonium est ajouté progressivement (concentration finale : 65% de saturation).

Après une agitation d'une heure, le précipité est séparé par centrifugation (12 000 g, 30 mn), dissous dans du tampon borate 0,01 M, pH 8, puis dialysé contre le même tampon (3 changements de tampon).

4. Chromatographie sur DEAE Séphadex

Le précipité dialysé est appliqué sur une colonne de DEAE Séphadex A 25 (Pharmacia, Uppsala, Suède) (8 x 20 cm) (Fig. 2). Les premières purifications utilisaient un tampon borate de sodium 0,01 M, pH 8,6, pour équilibrer la colonne et une élution avec du KCl 0,1 M (MARTAL & DJIANE, 1975, P_{8x}). Actuellement, le même tampon est encore utilisé, mais à pH 8, ce qui permet à tout le matériel actif d'effluer directement (MARTAL & coll., 1977, P_{16x}, MARTAL, 1978, P_{17x}) alors qu'environ 80% du matériel appliqué reste adsorbé sur la colonne. Ce dernier est ensuite dialysé contre du tampon bicarbonate d'ammonium (0,025 M), puis lyophilisé.

5. Filtrations moléculaires sur gel

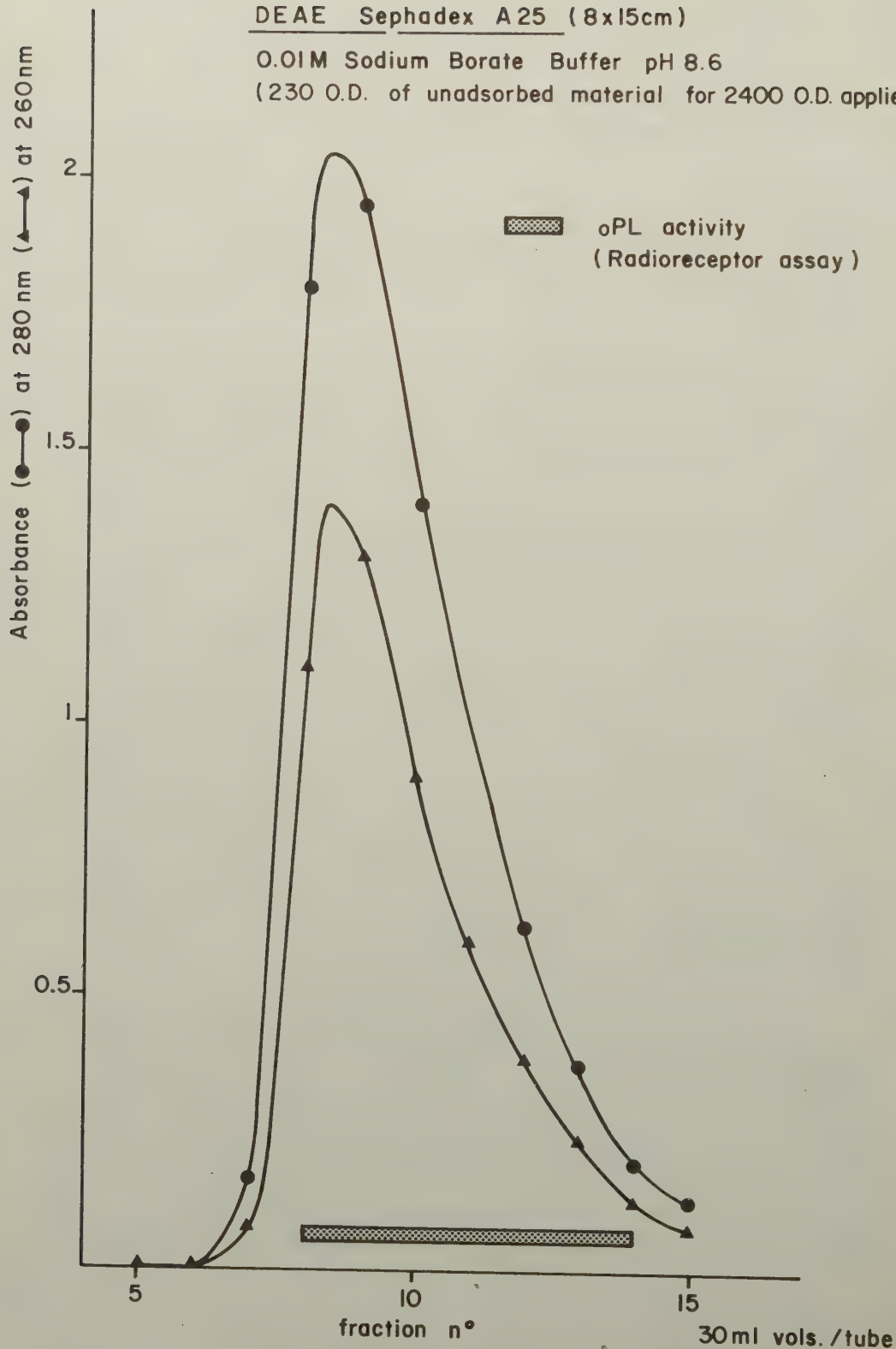
L'effluent de DEAE Séphadex est déposé sur une colonne préparative (4,5 x 140 cm, 45 ml/h) équilibrée avec du tampon bicarbonate d'ammonium 0,025 M, KCl 0,1 M. Cette force ionique n'évite pas l'agrégation de molécules d'oCS en dimères biologiquement actifs. Après avoir d'abord employé du gel Séphadex G 75 (Pharmacia) (Fig. 3) (MARTAL & DJIANE, 1975, P_{8x}), l'Ultrogel AcA 44 (LKB),

2

DEAE Sephadex A25 (8x15cm)

0.01M Sodium Borate Buffer pH 8.6

(230 O.D. of unadsorbed material for 2400 O.D. applied)

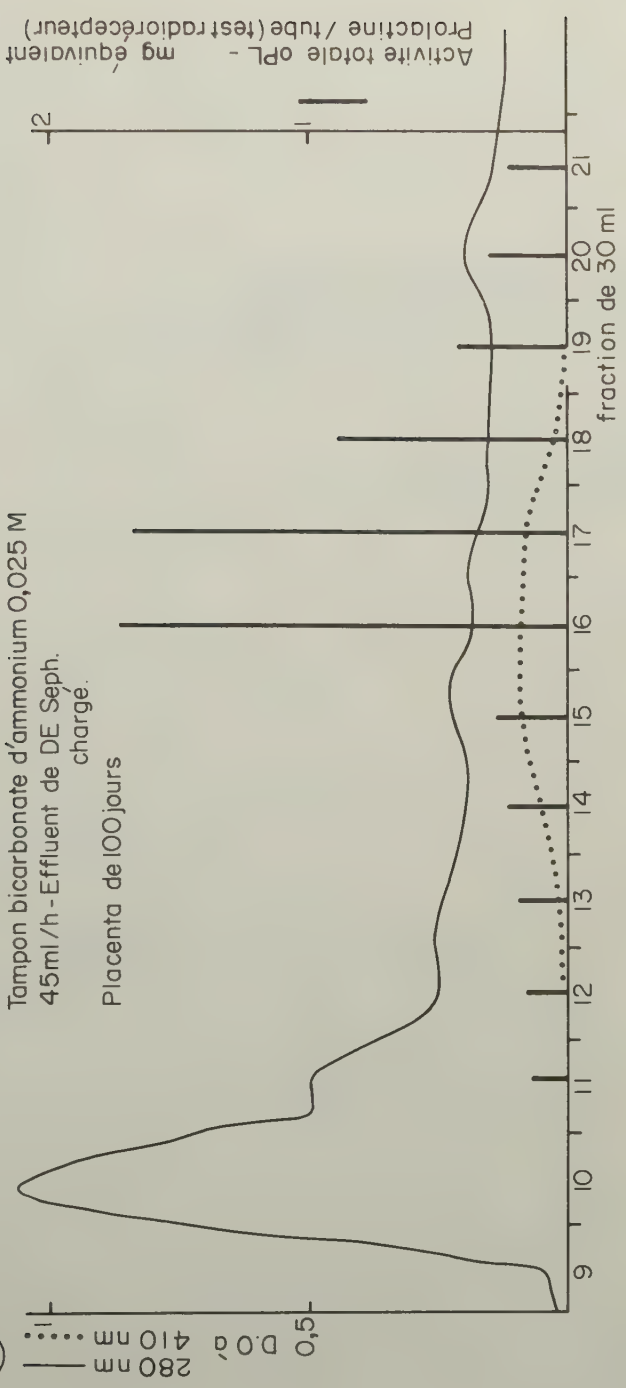


3

Sephadex G 75 S.F. (4 X 110cm)

Tampon bicarbonate d'ammonium 0,025 M
45ml/h - Effluent de DE Seph.
charge.

Placenta de 100 jours

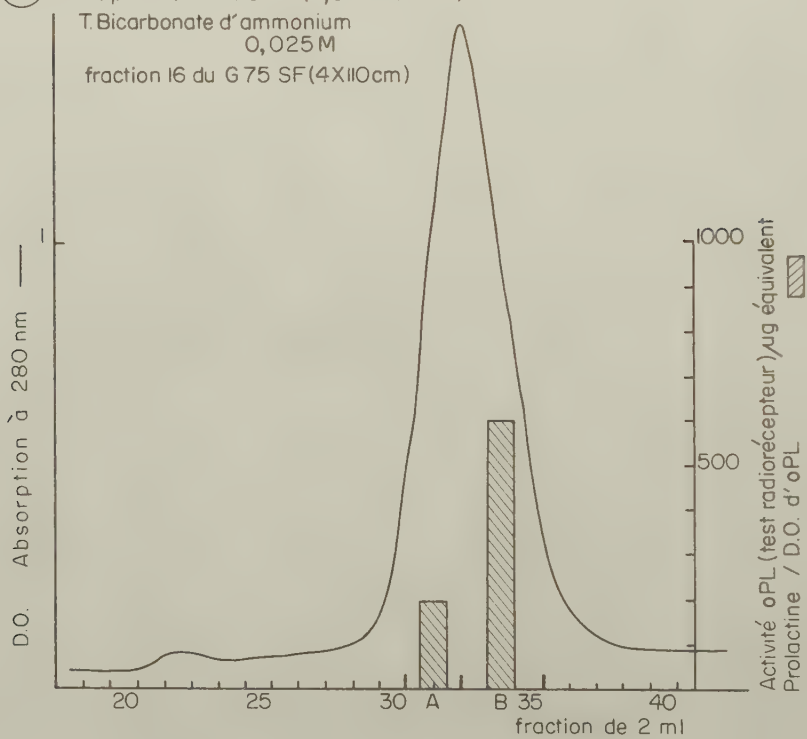


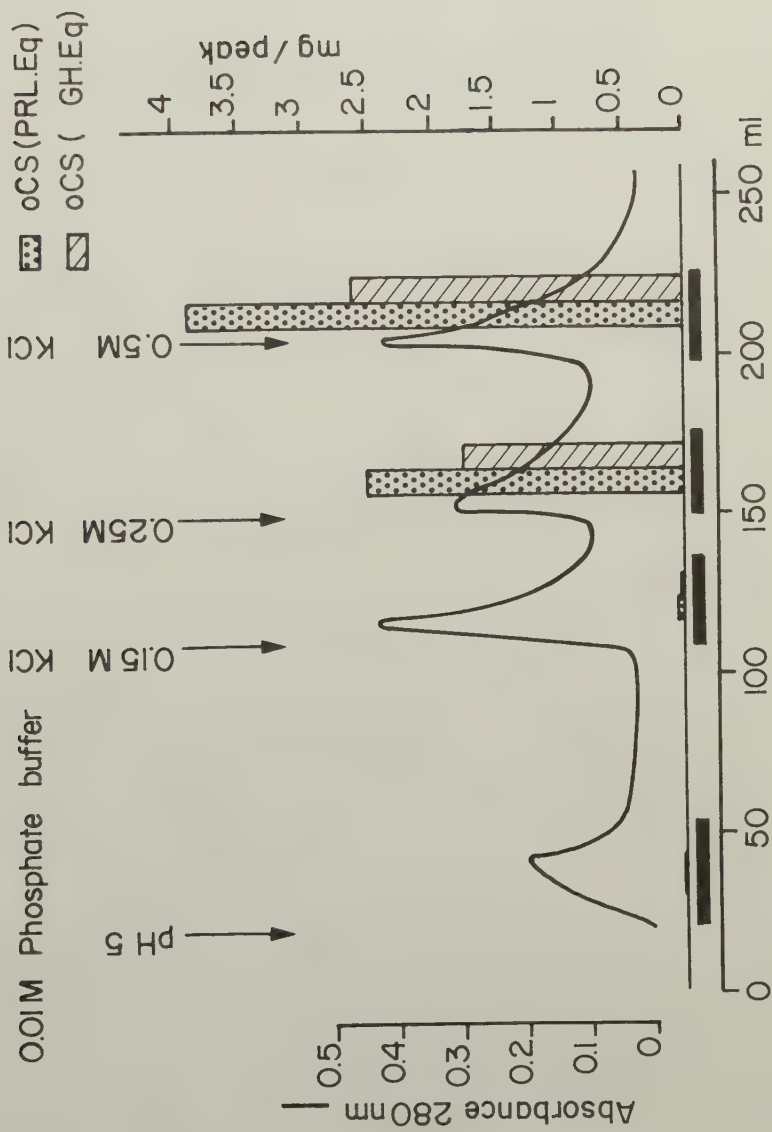
4

Sephadex G 75 SF (1,5 X 90 cm)

T. Bicarbonate d'ammonium
0,025 M

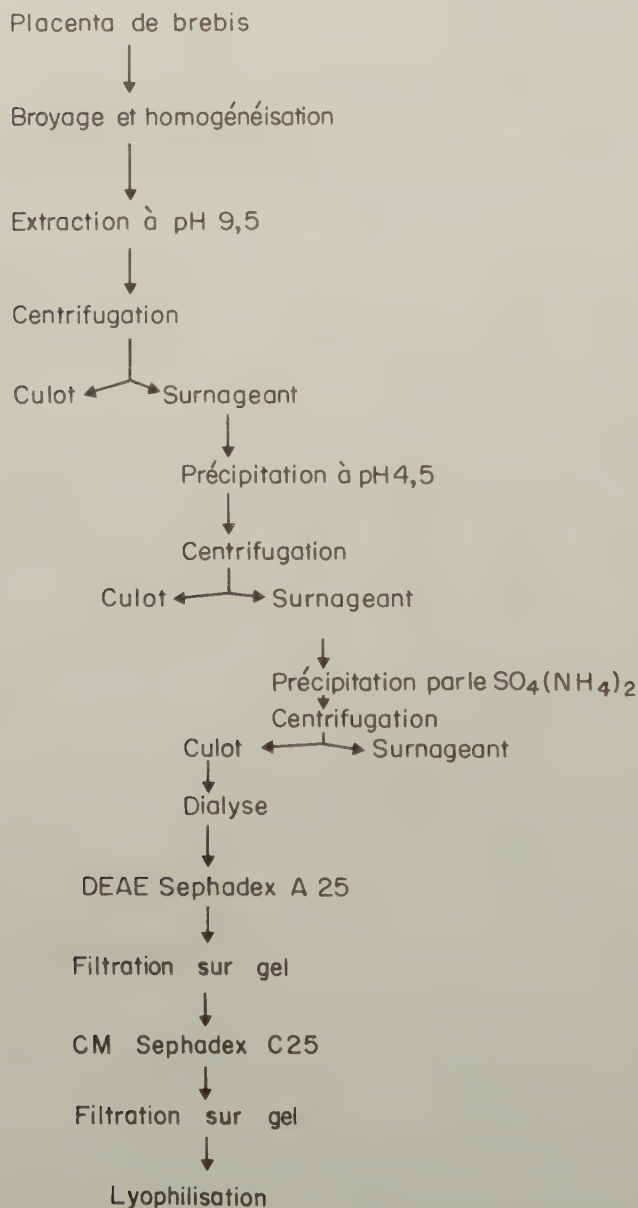
fraction 16 du G 75 SF (4 X 110 cm)





6

Principales étapes d'isolement de l'OPL



qui est un mélange d'acrylamide et d'agarose de fabrication récente, est actuellement préféré à cause de son pouvoir séparateur légèrement supérieur, et de sa vitesse d'écoulement plus élevée (MARTAL & coll., 1977, P_{16x}, MARTAL, 1978, P_{17x}). Les fractions d'élution sont dialysées contre de l'eau, lyophilisées et testées.

Avant la chromatographie sur Carboxy-méthyl-Séphadex, une deuxième filtration moléculaire sur Séphadex G 75 SF (Super Fine S.F., 1,5 x 90 cm) fut réalisée (Fig. 4) (MARTAL & DJIANE, 1975, P_{8x}).

6. Chromatographie sur CM Séphadex

Les fractions les plus actives et les plus homogènes sont déposées sur une colonne de CM Séphadex C 25 (Pharmacia) équilibrée dans du tampon phosphate 0,01 M, pH 5,0. Une élution graduelle est réalisée avec du KCl 0,15 M, 0,25 M et 0,5 M (Fig. 5) (MARTAL & coll., 1977, P_{16x}, MARTAL, 1978, P_{17x}). Actuellement, une filtration sur Ultrogel AcA 54 (1,5 x 180 cm) suit la chromatographie sur CM Séphadex pour les préparations les plus purifiées.

L'ensemble de ces diverses étapes de purification est résumé par la Fig. 6 ci-jointe.

7

Spécificité fonctionnelle des sites récepteurs lactogènes



site récepteur
lactogène

(Membranes de glande
mammaire de lapine)

bPRL oPRL hPRL



II) METHODES ANALYTIQUES

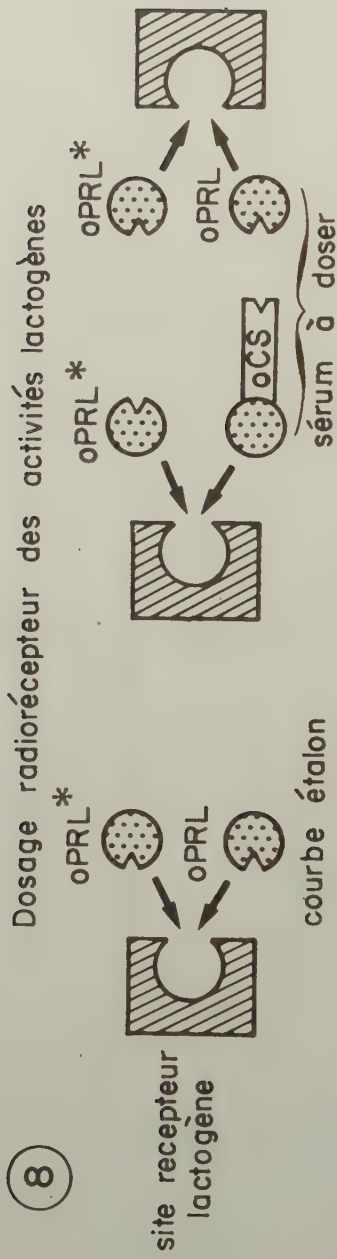
1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Elle est réalisée selon la méthode d'ORNSTEIN (1964) et DAVIS (1964). Le gel de migration contient 7,5% de polyacrylamide. Environ 50 à 150 μg de protéines sont mélangés à du sucrose à 40% (dilution finale : 8%) et déposés sur un gel de dépôt avec du bleu de Bromophénol. Le front de migration est repéré par ce colorant. La migration électrophorétique se fait avec un tampon Tris-glycine à pH 9,6. Elle dure environ 4 heures sous 2,5 milli-Ampères par tube. Les gels sont ensuite colorés avec de l'Amidoschwartz, puis décolorés avec de l'acide acétique à 7%. Cette technique permet d'apprécier l'homogénéité des diverses préparations d'hormones lactogènes placentaires.

2. Dosage radiorécepteur de l'activité lactogène

a) Principe : Les membranes cellulaires de glande mammaire sont porteuses de sites récepteurs lactogènes. Les propriétés de liaison de ces récepteurs sont schématisées sur la Fig. 7. On voit qu'il n'existe qu'une spécificité fonctionnelle, c'est-à-dire que toutes les molécules qui possèdent une activité lactogène peuvent s'y fixer, et qu'il n'existe pas, à la différence des anticorps, de spécificité d'espèces. Ainsi par exemple, les prolactines (ovine, bovine, humaine), l'hormone de croissance humaine (qui est lactogène à la différence des hormones de croissance ovine ou bovine) et les hormones lactogènes placentaires (ovine, bovine, humaine) peuvent se lier aux récepteurs lactogènes. Le dosage radiorécepteur des activités lactogènes consiste à mettre en compétition une hormone lactogène radioiodée (prolactine, par exemple) vis à vis des récepteurs membranaires de glande mammaire (de Lapine, notamment) avec

8



9

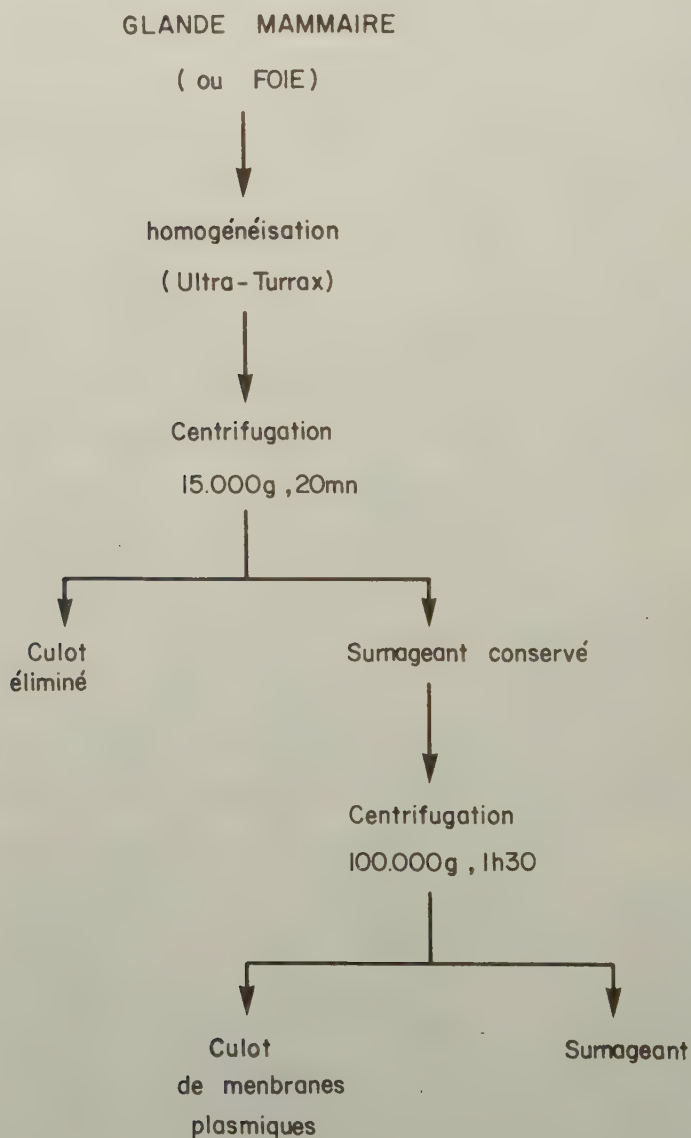


des concentrations de prolactine standard ou d'échantillons inconnus d'extraits placentaires ou de sérums (Fig. 8). Dans le cas des sérums d'animal gravide, la prolactine hypophysaire circulante est capable de déplacer l'hormone radioiodée comme le fait l'hormone lactogène placentaire. De même, si les extraits placentaires sont abondamment contaminés en prolactine foetale ou maternelle, le dosage radiorécepteur mesure l'activité lactogène totale sans distinguer entre les hormones lactogènes. Néanmoins, il est possible de déterminer l'activité lactogène propre à la prolactine par son dosage radioimmunologique (Fig. 9), car comme nous le verrons plus loin, il n'y a pas de réaction immunologique croisée entre la prolactine et l'hormone lactogène placentaire ovine. Par contre, il existe une identité immunologique partielle entre l'hormone de croissance humaine et l'hCS.

Aussi suffit-il, chez la Brebis, de soustraire les valeurs de prolactine des valeurs d'activité lactogène totale mesurée par dosage radiorécepteur, pour déterminer l'activité de l'hormone lactogène placentaire. Cette façon de faire présuppose évidemment un parallélisme étroit entre l'activité mesurée par dosage radioimmunologique et celle mesurée par radiorécepteur.

b) Technique : La méthode de SHIU & coll. (1973) est utilisée avec quelques modifications (MARTAL & DJIANE, 1975, P_{8x}, 1977, P_{14x}, P_{15x}).

1) Animaux : Des Lapines de race Néo-Zélandaise en lactation depuis 6 jours reçoivent pendant 48 h un traitement de bromocryptine (2 bromo- α -ergo-cryptine, CB 154, SANDOZ) à raison de 2 mg dans 2 ml, matin et soir pendant deux jours afin de désaturer les récepteurs mammaires de la prolactine endogène. En effet,



cette drogue permet le blocage de la libération hypophysaire de la prolactine. La préparation de la solution de bromocryptine est réalisée de la manière suivante : 1 g de bromocryptine est dilué avec 1 g d'acide tartrique dans de l'alcool tiède à 70°C. Du sérum physiologique (NaCl 9%) complète ce mélange pour un volume final de 1 l. La solution est conservée à la température du laboratoire dans un flacon fumé. A l'abattage des animaux (à 8 jours de lactation), les glandes mammaires sont prélevées et stockées à -15°C jusqu'au moment de l'utilisation (inférieur à 8 mois).

2) Préparation des membranes (Fig. 10)

Le tissu mammaire, encore congelé, est cassé en petits morceaux, puis, après décongélation, homogénéisé dans du sucrose 0,3 M à l'aide d'un broyeur Ultra-Turrax pendant 1 minute. L'homogénat est alors centrifugé à 15 000 g pendant 20 mn. Les cellules non broyées, les noyaux, les mitochondries et les lysosomes sont alors éliminés dans le culot. Le surnageant est centrifugé à 100 000 g pendant 1h30. Le culot de membranes plasmiques obtenu, qui comprend en réalité aussi les microsomes et les ribosomes, est mis en suspension dans du tampon Tris-HCl (25 mM, pH 7,6, $MgCl_2$ 10 mM) puis il est homogénéisé avec un Potter en téflon, fractionné en divers aliquotes et congelé à -15°C.

La concentration protéique des préparations de membranes est déterminée sur un aliquote par la méthode de LOWRY & coll. (1951).

3) Protocole expérimental : Les membranes décongelées sont diluées dans du tampon d'incubation Tris-HCl (25 mM, pH 7,6, $MgCl_2$ 10 mM) à une concentration de 200 μ g de protéines par 100 μ l.

La suspension membranaire est homogénéisée avant la répartition dans les tubes d'incubation avec un homogénéiseur Potter en téflon. Chaque tube d'incubation comprend :

- 50 μ l contenant 100 000 cpm de prolactine* ovine marquée à l'Iode 125 (KAMN, 1971) (80 μ Ci/ μ g) (PS₇ N.I.H.)

- 100 μ l de membranes

- Chaque tube de la courbe étalon comprend 50 μ l d'une concentration variable de prolactine standard (PS₇ N.I.H., 24 U.I./mg)

- Chaque échantillon d'extrait placentaire, dilué au 1/100, est de 50 μ l

- du tampon d'incubation en quantité suffisante pour un volume total de 500 μ l dans chaque tube. Deux tubes témoins sans hormone standard ni échantillons, mais avec prolactine*, membranes et tampon sont rajoutés ainsi que deux tubes ne contenant que de l'hormone radioactive. Lorsque des sérums sont dosés, 50 μ l de sérum de Brebis hypophysectomisée sont ajoutés à chaque tube de la courbe étalon. L'incubation dure 16 h à 4°C.

Elle est arrêtée en ajoutant 3 ml de tampon d'incubation froid à chaque tube et en centrifugeant à 2 500 g pendant 15 mn. Le surnageant est aspiré dans un flacon réservé à cet effet. Le culot des membranes contient les molécules d'hormones radioactives et non radioactives liées aux récepteurs. La radioactivité des culots des tubes d'incubation est mesurée dans un compteur à radiations γ . La courbe standard est calculée ainsi que la valeur des échantillons.

4) Caractéristiques du dosage radiorécepteur. La sensibilité du dosage radiorécepteur est t faible par rapport à celle du dosage radioimmunologique. Elle est de 20 ng de prolactine ou d'équivalent prolactine par ml d'extrait placentaire (ou de sérum).

D'après la représentation de SCATCHARD, la constante d'affinité du récepteur lactogène de glande mammaire de Lapine pour la prolactine est de $K_a = 3,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ (MARTAL & DJIANE, 1977, P_{15x}).

La précision du test est de l'ordre de 5%. Sa spécificité a été vérifiée : seules les hormones qui possèdent une activité lactogène sont capables d'entrer en compétition avec la prolactine ovine radioiodée (prolactine de diverses espèces, hormones lactogènes placentaires, hormone de croissance humaine).

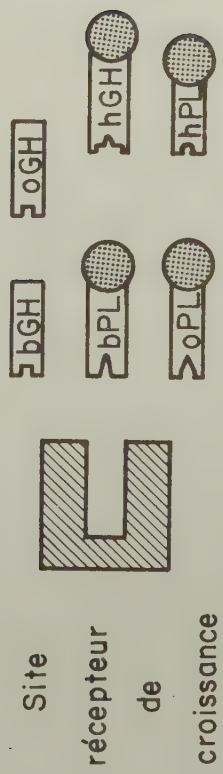
3. Dosage radiorécepteur de l'activité de croissance

Il est réalisé selon la méthode de TSUSHIMA & FRIESEN (1973) légèrement modifiée (MARTAL, 1978, P_{17x}).

a) Le principe est le même que celui du dosage radiorécepteur de l'activité lactogène, mais, au lieu d'utiliser des membranes de glande mammaire de Lapine qui ne possèdent pas de récepteurs à l'hormone de croissance, on emploie des membranes de foie de Lapine qui sont riches en récepteurs à l'hormone de croissance et très pauvres en récepteurs lactogènes (<2-5%). La spécificité fonctionnelle des sites récepteurs de croissance et le dosage radiorécepteur

11

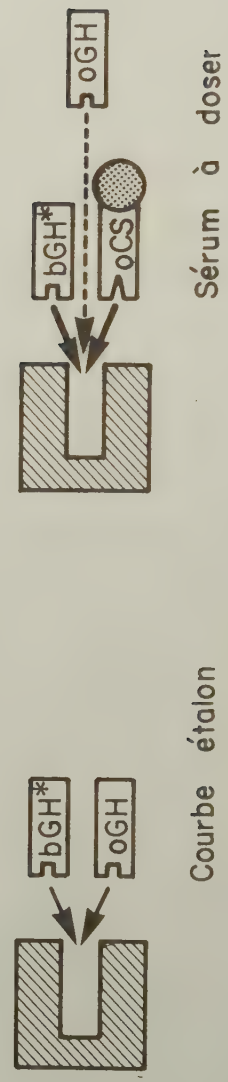
Spécificité fonctionnelle des sites récepteurs de croissance



(Membranes de foie)

12

Dosage radiorécepteur des activités de croissance



Courbe étalon

des activités de croissance sont schématisés sur les Fig. 11 et 12 (MARTAL, 1979, P₂₅).

A la place de la prolactine, on marque de l'hormone de croissance à l'iode radioactif.

b) Technique

1) Animaux : des Lapines de race Néo-Zélandaise sont sacrifiées à partir du 17ème jour de gestation pour le prélèvement de foie.

2) La préparation des membranes d'hépatocytes est identique à celle de tissu mammaire.

3) Radioiodation de l'hormone de croissance
Comme pour la prolactine radioactive aimablement marquée par KANN, la radioiodation de l'hormone de croissance suit la méthode à la chloramine T de GREENWOOD (1963) mais avec diverses modifications en raison de la labilité de cette hormone (MARTAL, 1972, P₃).

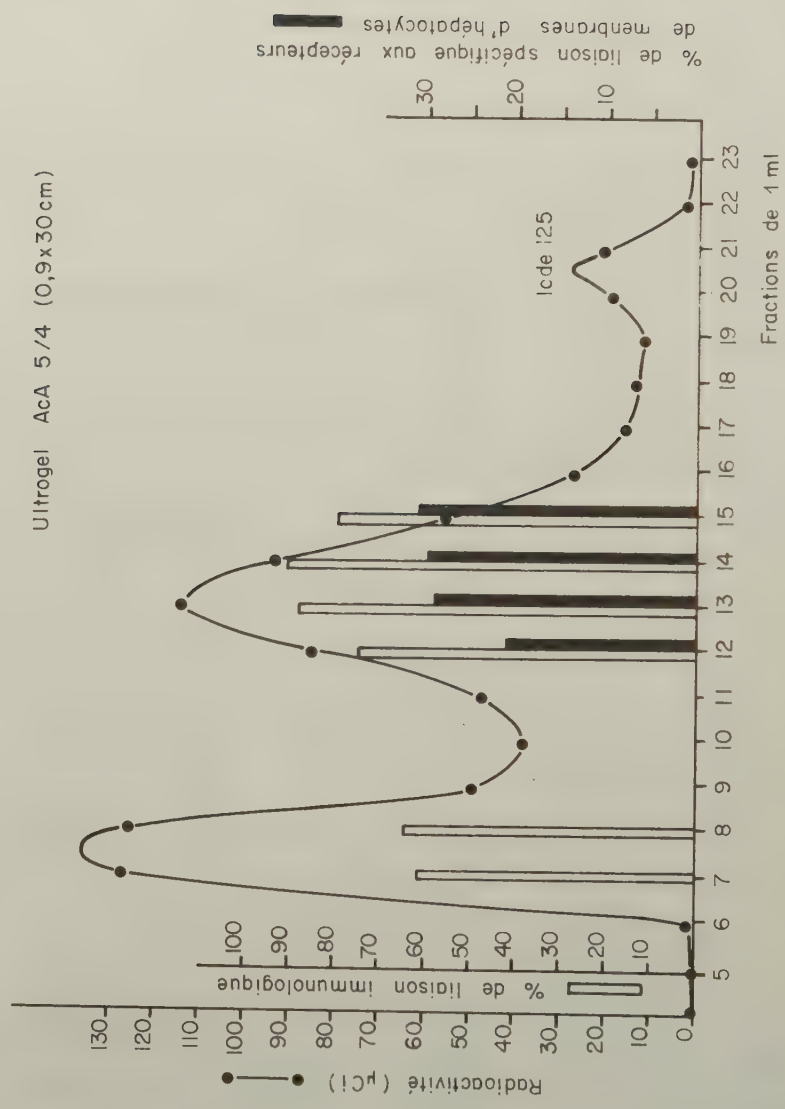
L'iode radioactif 125 provient d'AMERSHAM. L'iodure radioactif de sodium (1 mCi) livré en solution très alcaline est neutralisé avec un volume égal de tampon phosphate 0,5 M, pH 7,5.

L'hormone spéciale de marquage, l'hormone de croissance bovine bGH du lot N.I.H. 0743B, est dissoute dans du tampon phosphate 0,05 M, pH 7,5 à raison de 20 μ l pour 20 μ g.

L'oxydation de l'hormone est réalisée pendant 20 s à la température du laboratoire en ajoutant 30 μ g de chloramine T (dans 30 μ l du tampon phosphate 0,05 M, pH 7,5).

La réaction est arrêtée avec 60 μ g de métabisulfite de sodium (dans 100 μ l du même tampon). Puis 50 μ l de sérum de Brebis hypophysectomisée sont

Purification de la bGH N.I.H (0743 B) radioiodée



ajoutés au mélange réactionnel qui est déposé sur une colonne d'Ultrogel AcA 54 (0,9 x 30'cm). La colonne est équilibrée et éluée avec du tampon Véronal (0,05 M, pH 8,6, sérumalbumine humaine 2%, merthiolate de sodium 0,1%). La Fig. 13 représente le profil d'élution de l'hormone de croissance marquée.

4) Choix des fractions radioactives de bGH. Les meilleures fractions d'élution de ^{125}I -bGH, c'est-à-dire celles qui sont les plus capables de se lier aux récepteurs membranaires, sont testées au cours d'une incubation courte (2 h à 37°C) en présence de membranes (200 μg par tube) et d'hormone de croissance non radioactive en excès (bGH PENTEX, 100-1000 ng).

5) Le protocole expérimental et les caractéristiques du dosage radiorécepteur de l'activité de croissance sont identiques aux précédents. Les hormones de croissance ovine ou bovine N.I.H. (1 U.I./mg) ou bovine de PENTEX (1 U.I./mg) sont utilisées comme standard. L'incubation est toute-fois plus courte et peut être réduite à 5 h à la température de la pièce. La constante d'affinité des sites récepteurs d'hormone de croissance est du même ordre de grandeur $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ que celle des sites lactogènes.

4. Dosage radioimmunologique de la prolactine ovine

Il a été régulièrement et amicalement réalisé par Guy KANN (1972).

5. Dosage radioimmunologique de l'hormone de croissance ovine. Il est réalisé selon la méthode à double anticorps de MARTAL (1973, P₅).

Tableau III

Résultats des principales étapes de purification de l'oCS (1975)

Etapes de purification	Protéines (1) (mg)	Activité lactogène totale (mg) (2)	% d'activité totale retrouvée	Activité spécifique (3)	Purification
Extrait brut	54 000	31	100	0,57	1
Précipitation à pH 4,5	14 750	33,5	108	2,3	4
Précipitation au sulfate d'ammonium	2 275	20,6	61,5	9	15,6
DEAE Sephadex	210	12,25	59	58	100
1er Sephadex G75SF	30	5,5	45	183	320
2ème Sephadex G75SF	5	3	55	600	1 056

(1) approximativement 10% du poids du tissu frais

(2) exprimée en équivalents prolactine ovine (PS7 NIH 24 UI/mg), correspondant à environ 1,3 fois l'activité de croissance (exprimée en oGH NIH, 1 UI/mg)

(3) exprimée en équivalent prolactine ovine (mg) par g de protéine

B) RESULTATS DE LA PURIFICATION

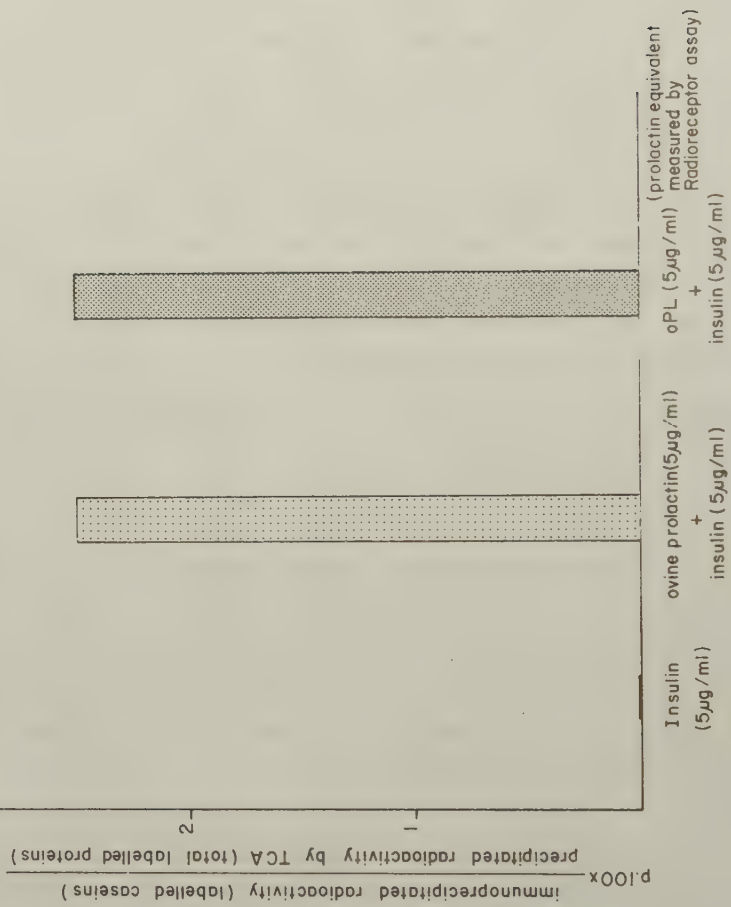
Le tableau III (MARTAL & DJIANE, 1975, P_{8x}) résume les divers résultats des étapes de purification. Lorsque l'activité des extraits bruts de placentas est comparée à celle de l'OCS purifiée, le facteur de purification est supérieur à 1000.

L'activité lactogène n'est pas détruite à pH 4,5 dans nos conditions expérimentales, et n'est pas adsorbée par la colonne de DEAE Sephadex qui retient en revanche les acides nucléiques et une grande partie de l'hémoglobine. Au cours de la filtration sur gel, l'OCS reste partiellement contaminée par de l'hémoglobine (Fig. 3) dont l'absorption caractéristique est à 410 nm.

A cette étape, les fractions d'élution sont analysées, d'une part pour déterminer leurs activités lactogènes et somatotropes par dosages radiorécepteurs et, d'autre part pour apprécier leur hétérogénéité par électrophorèse en gel de polyacrylamide avant toute purification plus poussée.

L'activité lactogène de l'OCS est confirmée in vitro par des tests de synthèse du lactose et des caséines (MARTAL & coll., 1975, C_{9x}, 1976, C₁₁) et son activité de croissance est démontrée également chez le Rat hypophysectomisé (MARTAL & DJIANE, 1977, P_{14x}, MARTAL, 1978, P_{17x}), comme nous le verrons plus loin. La Fig. 14 montre d'ailleurs une bonne correspondance entre les résultats de dosages par radiorécepteur et par test lactogène in vitro.

Comparative oPL activities in lactogenic test in vitro and Radioreceptor assay



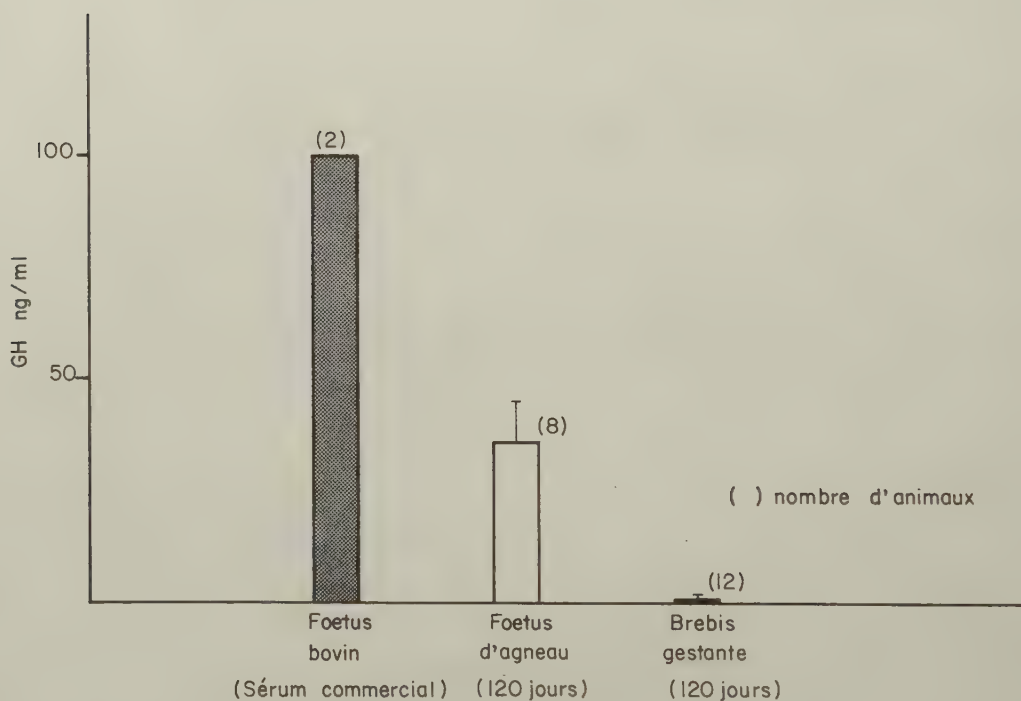
L'oCS purifiée n'est contaminée ni par la prolactine ni par l'hormone de croissance d'après les dosages radioimmunologiques de ces hormones (MARTAL & DJIANE, 1975, P_{8x}, MARTAL & coll., 1975, C_{9x}).

L'activité biologique des meilleures préparations d'oCS est de 20 U.I./mg en équivalent prolactine (PS₇ 24 U.I./mg) et de 0,8 U.I./mg en équivalent hormone de croissance ovine oGH (N.I.H. 1 U.I./mg) (Tableau I). Il est évident qu'il est absolument nécessaire d'évaluer l'activité de croissance de l'oCS en dosage radiorécepteur par rapport à l'oGH et non par rapport à l'hGH qui possède également une activité prolactinique comme l'oCS. La présence des deux activités somatotrope et lactogène de l'hormone purifiée nous a conduit (MARTAL & DJIANE, 1977, P_{14x}) à proposer pour cette hormone, le terme de Somatomammotrophine chorionique ovine, selon la terminologie internationale.

L'activité somatotrope des préparations d'oCS est toutefois plus labile que son activité lactogène (MARTAL, 1978, P_{17x}). De même, l'oCS radioiodée perd plus rapidement son activité de croissance que son activité lactogène. Cette activité est également plus fragile lors de la radioiodation.

15

Comparaison de divers taux plasmatiques moyens, déterminés par radiommunologie, d'hormone de croissance hypophysaire de Ruminants.



C) DISCUSSION

La Somatomammotrophine chorionique ovine a été la première purifiée parmi les hormones lactogènes placentaires des Ruminants. Cette hormone a été isolée et caractérisée simultanément par trois équipes différentes : une américaine (celle du Dr FELLOWS : HANDWERGER & coll., 1974, FELLOWS & coll., 1976, HURLEY & coll., 1977), une canadienne (celle du Dr FRIESEN : CHAN & coll., 1976) et par nous-mêmes (MARTAL & DJIANE, 1975, P_{8x}, MARTAL & coll., 1975, C_{9x}).

Bien que les trois groupes obtiennent des préparations possédant les deux fonctions lactogène et somatotrope, l'activité de celles-ci varie considérablement. C'est celle de CHAN & coll., 1976, qui paraît la plus active, puis la nôtre, puis celle du groupe de FELLOWS (Tableau I). Les méthodes de purification sont toutefois très comparables, et il est difficile d'expliquer l'origine des différences.

Il est intéressant de souligner que les préparations d'oCS présentent une activité de croissance nettement supérieure à celles de son homologue humain, l'hCS (Tableau I). La très faible activité somatotrope de l'hCS est de l'ordre de grandeur des contaminations de diverses hormones hypophysaires en hormone de croissance ovine (Tableau IV) déterminées par radioimmunologie (MARTAL, 1973, P₅). Néanmoins, la très grande analogie structurale entre l'hCS et l'hGH permettent d'admettre l'existence réelle de la très faible activité de croissance de l'hCS.

Une autre source de suspicion aurait pu provenir d'une contamination possible des préparations d'hCS par du sang foetal qui est riche en hormone de croissance (KAPLAN & GRUMBACH, 1965). Chez les

Ruminants, il aurait pu en être de même car le sérum de Veau foetal est riche en hormone de croissance (MARTAL, 1973, P₅) ainsi que le sérum de foetus d'Agneau (BASSETT & coll., 1970) ou d'Agneau nouveau-né (Fig. 15).

La présence d'une activité de croissance dans les préparations d'hormone placentaire de Singe (SHOME & FRIESEN, 1971) ainsi que dans celle des préparations d'hormones placentaires de Ruminants (Tableaux I et II) suggèrent donc fortement la possibilité de l'existence de molécules bifonctionnelles. Les critères d'homogénéité et d'activité de l'OCS semblent attester ce caractère. Néanmoins, une démonstration directe serait nécessaire. Cet important problème est étudié au chapitre suivant.

CHAPITRE II

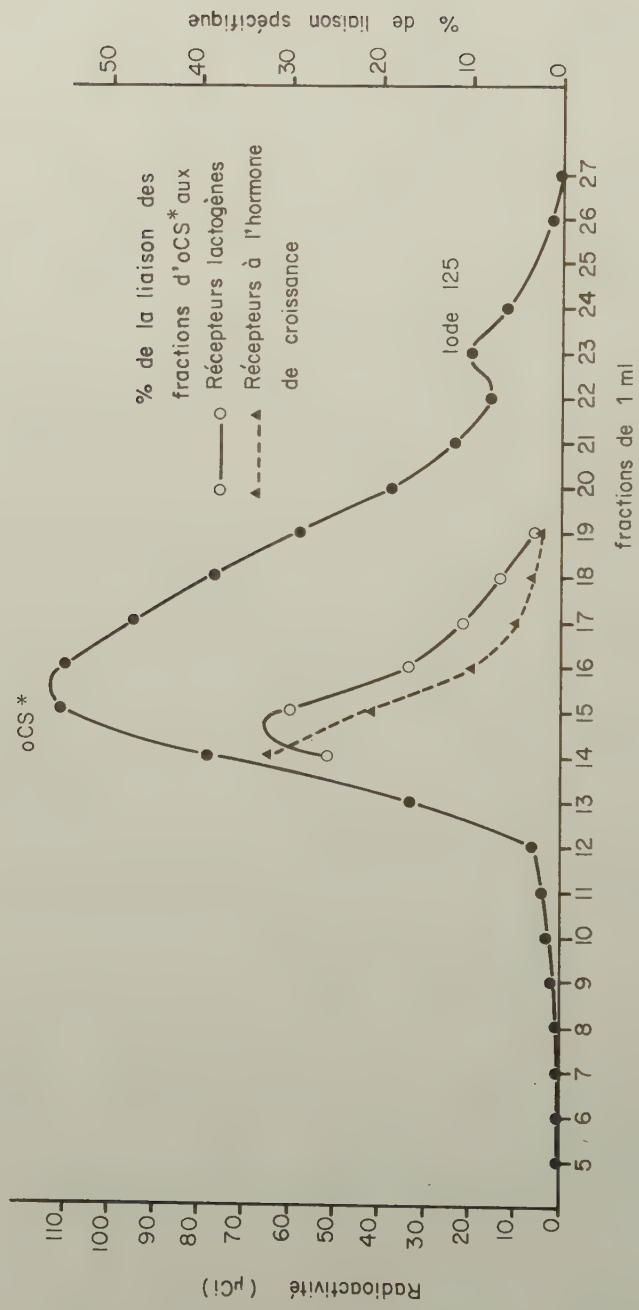
Caractère bicéphale de l'oCS

INTRODUCTION

Il est essentiel de savoir si l'hormone lactogène placentaire ovine, que nous avons purifiée, est réellement une molécule bifonctionnelle, ou bien si nous sommes en présence d'un mélange de deux hormones placentaires, l'une possédant l'activité de croissance, et l'autre l'activité lactogène. Dans ce dernier cas, nous ne serions pas parvenu à dissocier ces protéines qui présenteraient un poids moléculaire et un comportement électrophorétique identiques. Leurs propriétés immunologiques ne permettraient pas non plus de les distinguer. Cette éventualité est faible, mais pas impossible. En effet, on a été incapable, pendant des années, de dissocier la prolactine humaine de l'hormone de croissance humaine en raison de la très grande similitude de leurs propriétés physicochimiques (LEWIS & coll., 1972, NIALL, 1972). En revanche, ce ne fut pas le cas de l'isolement de la prolactine et de l'hormone de croissance ovine ou bovine, par exemple, dont les propriétés physicochimiques sont nettement distinctes. Pour résoudre ce difficile problème, nous avons mis au point une méthode basée sur la différence des propriétés fonctionnelles des molécules étudiées.

16

Purification de l'oCS*radioiodée par filtration sur Ultrogel AcA 5/4



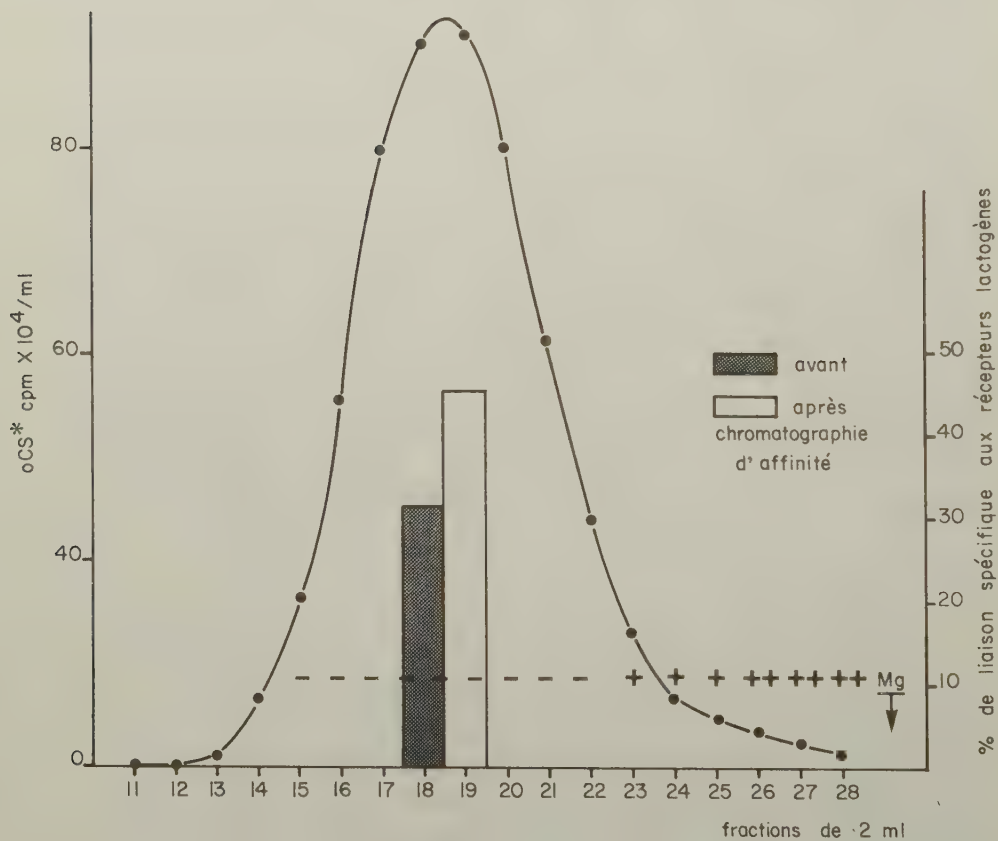
METHODE DE CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR MEMBRANES CELLULAIRES DE TISSU MAMMAIRE.

Principe : L'OCS radioactive (OCS^*) est fixée sur des membranes de glande mammaire de Lapine qui ne possèdent pas de sites récepteurs à l'hormone de croissance. L'OCS* liée aux récepteurs lactogènes est ensuite éluee au moyen de Chlorure de Magnésium, selon la méthode de désaturation in vitro des récepteurs (LEBLANC & coll., 1977). Après avoir éliminé ce sel par filtration sur gel Séphadex, l'OCS* éluee (OCS_e^*) des récepteurs prolactiniques doit pouvoir, si elle n'est pas dénaturée et si elle présente une structure moléculaire bicéphale, se fixer, d'une part, sur les récepteurs à l'hormone de croissance de membranes cellulaires de foie et, d'autre part, sur les récepteurs prolactiniques des tissus hépatiques et mammaires. Par contre, s'il existe deux protéines hormonales placentaires distinctes, seule, celle à activité lactogène devrait être retenue sur le tissu mammaire. Après élution, elle devrait se refixer seulement sur des récepteurs prolactiniques.

Technique :

1. Radioiodation de l'OCS : une méthode identique à celle décrite pour le marquage de l'hormone de croissance est utilisée. Environ 1 mCi d' ^{125}I Na d'Amersham, dilué dans du tampon phosphate (0,5 M), pH 7,5, (v/v), est ajouté à une quantité d'hormone lactogène placentaire ovine, équivalente à 10 μg de prolactine, très purifiée, diluée dans 10 μl de tampon phosphate 0,05 M (pH 7,5). L'oxydation par la Chloramine T (30 μg /10 μl de tampon phosphate 0,05 M) dure 30 secondes à 20°C. La réaction est arrêtée avec 60 μg de métabisulfite de sodium (dans 10 μl du même tampon). Du sérum de Brebis hypophysectomisée (50 μl) est utilisé comme entraîneur pour éviter l'adsorption de l'hormone marquée.

Filtration de l'oCS* éluée de membranes de glande mammaire
sur Séphadex G25 coarse (0,9x30 cm)



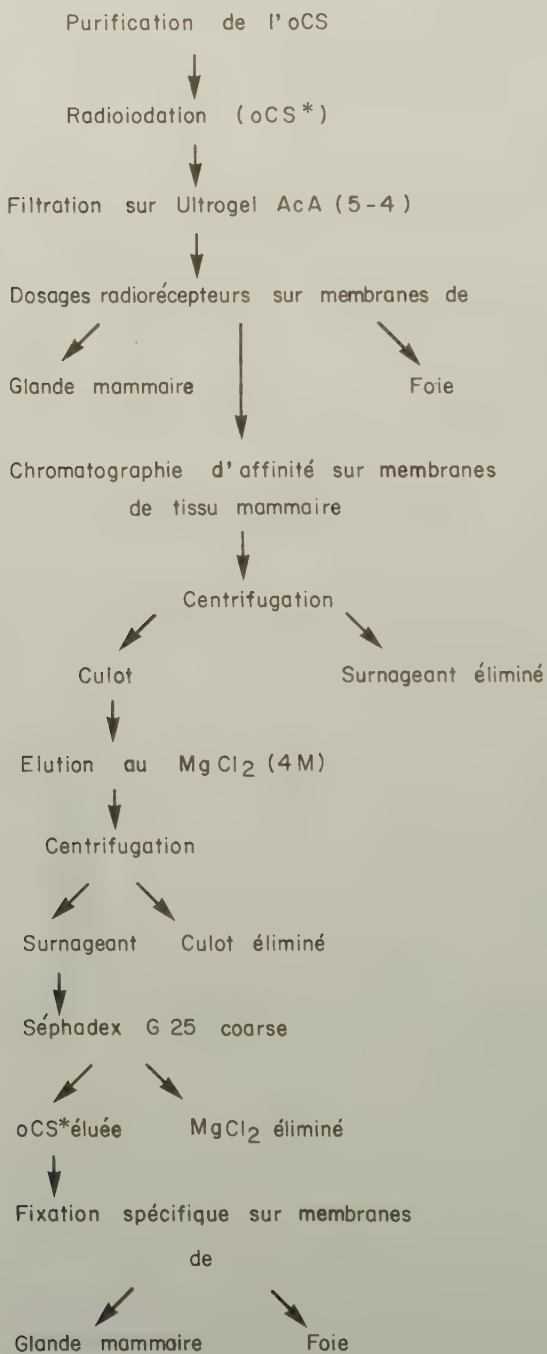
2. Purification de l'oCS^{*} sur Ultrogel :

Une colonne de 30 ml d'Ultrogel AcA 5/4 est équilibrée dans du tampon véronal 0,05 M, pH 8,6, contenant de la sérumalbumine humaine à 2,5%, du merthiolate (0,1%) et de la benzamidine (0,1 M) qui est un inhibiteur de protéases.

La Fig. 16 présente un profil typique d'élution de l'hormone lactogène placentaire ovine radioiodée. Le rendement d'iodation de l'oCS^{*}, c'est-à-dire le rapport de l'hormone marquée élue à la quantité totale de radioactivité de l'éluat, est d'environ 95%. L'activité spécifique de l'oCS^{*} est d'environ 100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

3. Test d'activité biologique des fractions d'oCS^{*} : La liaison des différentes fractions d'élution aux récepteurs lactogènes et somatotropes est testée respectivement à partir de membranes cellulaires de glande mammaire et de foie (Fig. 16). Seules les fractions les plus actives sont utilisées et conservées à 4°C. L'incubation est rapide : 2 h à 37°C ; les diverses fractions d'oCS^{*} (100 000 cpm/tube) sont mises en présence d'une quantité constante de membranes (200 μg) et d'hormone non radioactive en excès (prolactine ou hormone de croissance ovines, 1 μg /tube).

4. Chromatographie d'affinité proprement dite sur membranes de tissu mammaire : Quand la meilleure fraction d'oCS^{*} radioiodée a été déterminée, une quantité d'environ 1 million de cpm par tube à raison d'une trentaine de tubes, sont incubés, chacun en présence de 400 μg de membranes de glande mammaire de Lapine. Après 4 h d'incubation à 20°C, 3 ml du tampon d'incubation froid (à 4°C) sont ajoutés. Les tubes sont centrifugés (2 500 g, 15 mn) et le surnageant, qui comprend l'oCS^{*} non fixée aux récepteurs membranaires, est éliminé.



5. Elution de l'oCS^{*} avec du MgCl₂ (4 M) :

Chaque culot de centrifugation précédent est dilué avec 200 μ l de Chlorure de Magnésium (4 M). Les membranes sont remises en suspension au moyen d'une pipette Pasteur, puis agitées au Vortex. Après 5 à 10 mn de contact, les membranes sont centrifugées (2 500 g, 15 mn) et les surnageants sont récupérés et mélangés.

6. Elimination du Chlorure de Magnésium :

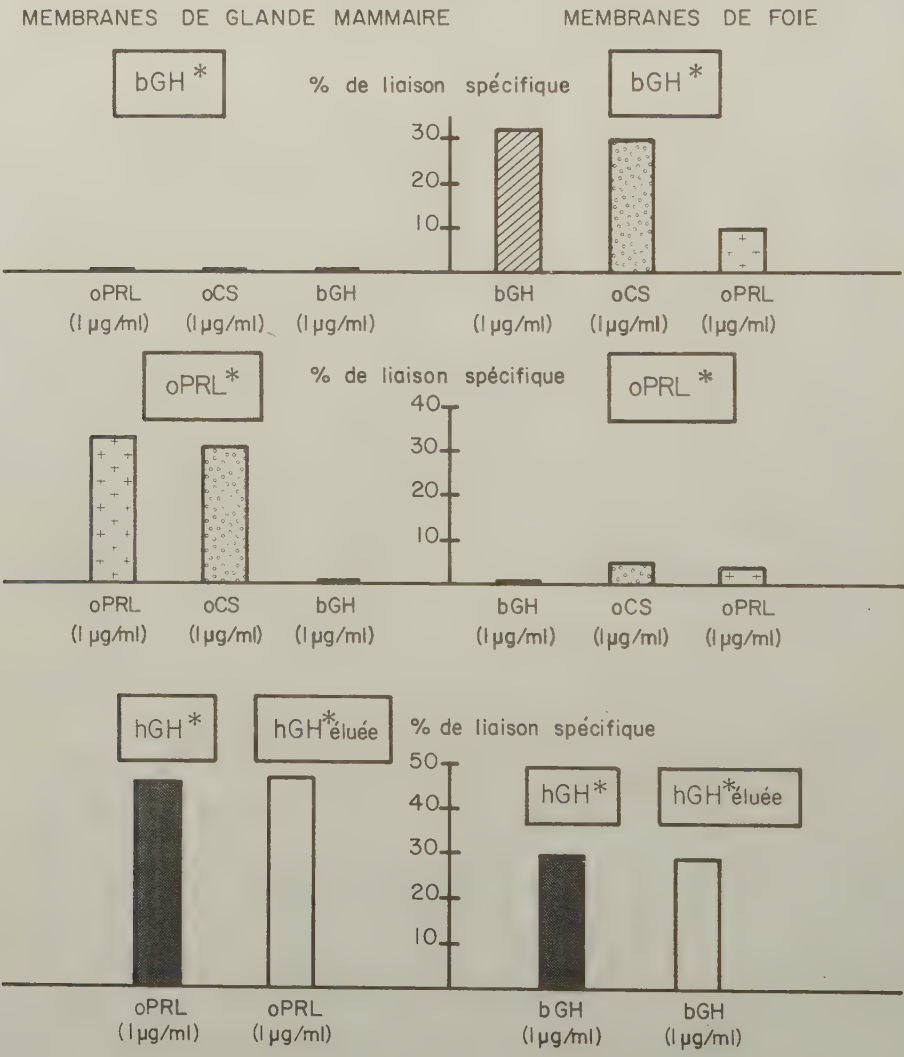
Après une nouvelle centrifugation, les surnageants précédents sont déposés sur une colonne de Séphadex G25 coarse (0,9 x 30 cm) équilibrée dans du tampon Tris-HCl 25 mM, pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, sérumalbumine 0,1%. Les fractions d'élution (2 ml) contenant de fortes concentrations de MgCl₂ sont repérées par précipitation de Mg(OH)₂ après addition de 100 μ l de NaOH (1 N) puis éliminées (Fig. 17). L'oCS^{*} éluee (oCS_e^{*}) est alors testée. Le rendement total de la chromatographie d'affinité après élution de l'oCS^{*} et élimination du Chlorure de Magnésium est d'environ 30% dans nos conditions expérimentales.

7. Tests d'activité de l'oCS_e^{*} :

L'oCS_e^{*} est mise en présence, soit de membranes de glande mammaire dans les conditions habituelles de dosages radiorécepteurs, soit de membranes d'hépatocytes (Chapitre I).

Ces diverses étapes sont résumées sur la Fig. 18.

LIAISONS COMPAREES de bGH*, oPRL*, hGH*, hGH*éluee du tissu mammaire
AUX RECEPTEURS LACTOGENES et AUX RECEPTEURS A L'HORMONE
DE CROISSANCE



RESULTATS

Le comportement de l'hormone lactogène placentaire ovine vis-à-vis des récepteurs à la prolactine et à l'hormone de croissance a été comparé à celui d'hormones monocéphales, la prolactine ovine et l'hormone de croissance bovine, et à celui d'une hormone bicéphale, l'hormone de croissance humaine. Les résultats des divers tests sont résumés dans les figures 19 et 20.

Seul le pourcentage de la liaison spécifique est représenté, c'est-à-dire le pourcentage de la différence entre la quantité d'hormone radioactive liée aux membranes (bGH*, oPRL*, oCS*, etc...) et la quantité de celle-ci fixée aux membranes en présence d'hormone non radioactive (bGH, oPRL, oCS, etc...) en excès (1 µg/ml). Cette concentration d'hormone en excès a été déterminée par dilutions successives d'hormone non radioactive (Chapitre I).

Nous observons (Fig. 19) que l'hormone de croissance bovine marquée ne se lie pas aux membranes de cellules épithéliales mammaires, mais aux membranes d'hépatocytes. Il en résulte, d'une part, que l'hormone radioiodée est peu dégradée et, d'autre part, que le tissu mammaire de Lapine ne présente pas de sites récepteurs à l'hormone de croissance. Cette expérience démontre directement que l'hormone de croissance hypophysaire de Ruminants est monofonctionnelle, c'est-à-dire qu'elle ne se fixe que sur un seul type de récepteur. En revanche, la prolactine ovine radioactive se lie aux sites récepteurs lactogènes du tissu mammaire (Fig. 19). Elle n'est pas déplacée par l'hormone de croissance bovine (Pentex, 1 U.I./mg), ce qui souligne la très faible contamination prolactinique de

Tableau IV

Estimation par radioimmunologie
de la quantité d'hormone de croissance
dans différentes hormones hypophysaires ovines

Hormones hypophysaires	Hormone de croissance ovine
ACTH M65 BYLA	0,6%
FSH S1 N.I.H.	non détectable
LH S8 N.I.H.	non détectable
LH M3 COURTE-JUTISZ.	non détectable
Prolactine S7 N.I.H.	0,6%
Prolactine S9 N.I.H.	0,15%
Prolactine ovine BYLA	2%
TSH S2 N.I.H.	0,6%

Tableau V

Contaminations prolactiniques
de diverses préparations
d'hormones hypophysaires de croissance

HORMONES DE CROISSANCE	PROLACTINE *
ovine (oGH S ₁₀ N.I.H.)	5%
bovine (bGH B ₁₅ N.I.H.)	5%
ovine (oGH S ₅ N.I.H.)	1%
ovine (oGH S ₉ N.I.H.)	1%
bovine BYLA	0,2%
bovine (bGH B ₁₂ N.I.H.)	0,2%
ovine de FERGUSSON & WALLACE	non détectable
ovine de DULOR	non détectable
bovine de PENTEX	non détectable

* estimée par dosage radioimmunologique

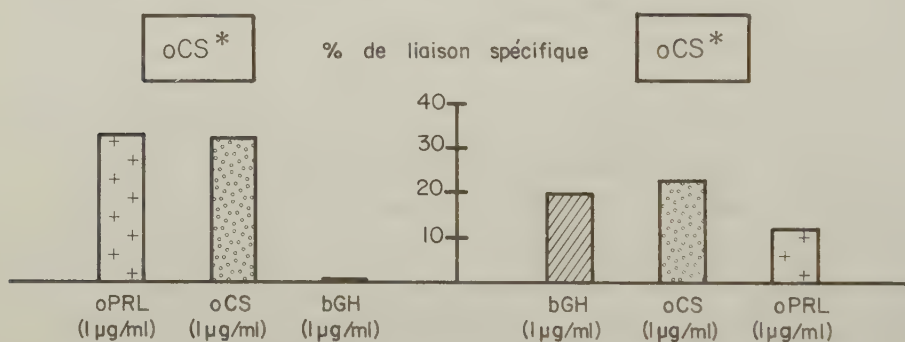
cette hormone (Tableau IV). Après élution de la prolactine radioactive utilisée et sa refixation sur membrane de tissu mammaire de Lapine, le taux de liaison spécifique de l'hormone n'est en général pas amélioré, ce qui signifie que l'hormone est relativement peu dégradée par la méthode de marquage (KANN, 1971), et que sa repurification n'améliore pas la liaison avec le récepteur lactogène. L'OCS non radioactive, exprimée en équivalent prolactine lors d'autres dosages, présente dans ces tests la même capacité de liaison vis-à-vis du tissu mammaire que la prolactine non radioactive aux concentrations identiques (1 $\mu\text{g/ml}$).

Au niveau du foie, la prolactine radioactive montre une liaison spécifique d'environ 4-5% en présence d'un excès d'hormone lactogène placentaire ou de prolactine ovines. Ce taux de liaison est intéressant à comparer à celui (10% environ) de la bGH³² aux membranes de foie lors d'un déplacement par la prolactine ovine à la même concentration. Cette différence de liaison peut résulter de la petite contamination de la prolactine ovine PS 7 N.I.H. en hormone de croissance, estimée par dosage radioimmunologique à environ 1% (Tableau V). Mais il reste un excès de déplacement d'environ 4% (dans nos conditions expérimentales) qui est régulièrement reproductible et très légèrement amplifiable à très forte concentration de prolactine (10 $\mu\text{g/ml}$). Si nos estimations de la contamination de la prolactine ovine PS 7 en hormone de croissance étaient sous estimées, il faudrait admettre aussi que le contaminant en hormone de croissance puisse être marqué également à l'iode radioactif. Il devrait être alors déplaçable par l'hormone de croissance bovine dans le test radiorécepteur de foie, ce qui n'est pas le cas

LIAISONS COMPAREES de l'oCS* et de l'oCS* éluee du tissu mammaire
AUX RECEPTEURS LACTOGENES et aux RECEPTEURS A L'HORMONE DE
CROISSANCE

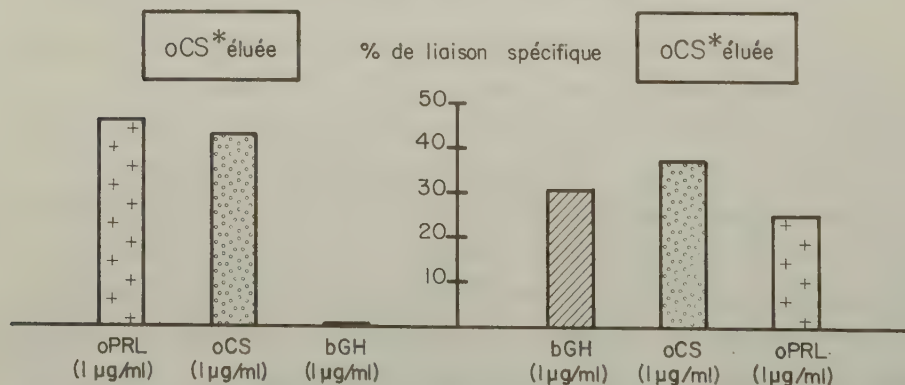
MEMBRANES DE GLANDE MAMMAIRE

MEMBRANES DE FOIE



MEMBRANES DE GLANDE MAMMAIRE

MEMBRANES DE FOIE



puisque la liaison spécifique n'excède pas 1%. L'excès de déplacement de la bGH* par l'OPRL doit donc plutôt être imputé à une interférence de la prolactine ovine, quand elle est à forte concentration, dans la liaison spécifique de la bGH* avec son récepteur hépatique.

De ces études de compétition en présence de la prolactine* radioactive vis-à-vis des récepteurs lactogènes et somatotropes, nous pouvons déduire, premièrement, que cette hormone est monofonctionnelle, c'est-à-dire qu'elle ne se fixe que sur les récepteurs lactogènes (une seule réserve étant toutefois faite lors d'excès d'hormone non radioactive), deuxièmement, que le tissu hépatique présente des récepteurs lactogènes mais à une concentration très faible, de l'ordre de 5%.

Lorsque l'on fixe de l'hormone de croissance humaine radioactive (Fig. 19) sur des membranes de foie ou de glande mammaire, le taux de liaison spécifique est respectivement d'environ 30% et 45%. Si l'on fixe de l'hGH* sur des membranes de glande mammaire, puis si on l'élue avec du Chlorure de Magnésium, l'hGH_e* élue se lie de nouveau aux mêmes taux.

Ces tests de compétition comparés démontrent que l'hGH est bifonctionnelle, à la différence de la bGH et de la prolactine ovine. Ces résultats sont en accord rigoureux avec nos connaissances sur ces divers types de molécules, telles que nous les analyserons au Chapitre V.

Lorsque l'on fixe de l'hormone lactogène placentaire ovine radioactive oCS* sur des membranes de glande mammaire (Fig. 20), le taux de liaison spécifique, en présence de prolactine ovine en excès (1 µg/ml)

ou d'oCS* non radioactive en excès (à une concentration équivalente à 1 $\mu\text{g/ml}$ de prolactine ovine) est d'environ 30%. L'hormone de croissance bovine ne déplace pas l'oCS* sur les récepteurs lactogènes du tissu mammaire. Vis-à-vis des récepteurs de membranes hépatiques, l'oCS* paraît se fixer, d'une part, aux récepteurs à l'hormone de croissance (20% environ de liaison spécifique en présence de bGH) et d'autre part, aux récepteurs prolactiniques du foie. La prolactine ovine non radioactive déplace environ 12% d'oCS*, ce qui est nettement plus important que le taux de liaison spécifique (environ 5%) correspondant aux seuls récepteurs lactogènes. Il s'ensuit que la prolactine ovine paraît déplacer, lorsqu'elle est en excès, une petite quantité d'oCS* fixée sur les récepteurs à l'hormone de croissance ou du moins, en gêner la fixation. L'oCS non radioactive déplace une plus grande quantité d'oCS* que la bGH ; elle se fixe donc probablement à la fois aux récepteurs somatotropes et aux récepteurs lactogènes. Cette différence de taux de liaison est inférieure à 5%, ce qui correspond bien au pourcentage estimé de récepteurs prolactiniques du foie.

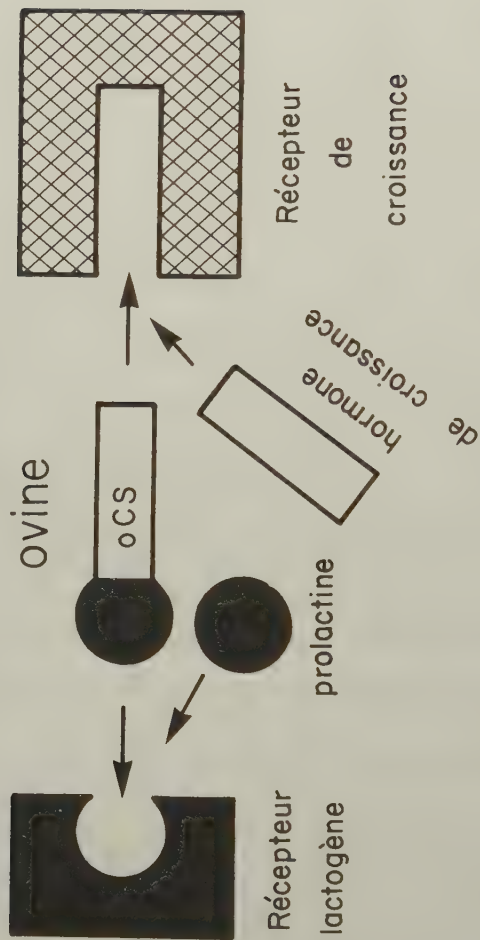
Lorsque l'on fixe de l'oCS* sur des membranes de glande mammaire, puis qu'on l'élue avec du Chlorure de Magnésium, l'oCS* élue n'est pas dégradée. Elle est même repurifiée par cette technique de chromatographie d'affinité, car son pourcentage de liaison spécifique au récepteur lactogène est d'environ 45% au lieu de 30%. Son taux de liaison spécifique est également amplifié (d'environ 10%) vis-à-vis des récepteurs à l'hormone de croissance du foie. La prolactine ovine à forte concentration (1 $\mu\text{g/ml}$) est également capable de déplacer l'oCS* à un taux de 25%, ce qui est très

nettement supérieur à celui qui correspond aux récepteurs lactogènes. Il s'ensuit que la prolactine ovine paraît plus facilement déplacer l' oCS_e^* des sites récepteurs d'hormone de croissance que la bGH^* . L'affinité du site récepteur de croissance des membranes hépatiques de Lapine est donc plus forte pour la bGH que pour l' oCS . Ces résultats confirment, au moyen de l' oCS_e^* éluée, ceux obtenus avec l' oCS non repurifiée. Enfin, l' oCS_e^* est déplacée par l' oCS non radioactive, à un taux de liaison spécifique correspondant sensiblement à la somme des taux de liaisons de l' oCS_e^* aux récepteurs de croissance et aux récepteurs prolactiniques du foie, ce qui confirme les résultats précédents avec l' oCS^* non repurifiée.

Puisque l' oCS_e^* éluée des récepteurs lactogènes est capable de se lier aux récepteurs à l'hormone de croissance, l'hormone lactogène placentaire ovine est donc bicéphale (Fig. 21). Tous les résultats précédents de compétition le démontrent. Ils démontrent aussi que la dénomination de Somatomammotrophine Chorionique ovine (oCS) est correcte pour l'hormone lactogène placentaire ovine.

21

Hormone lactogène placentaire



DISCUSSION

La méthode de chromatographie d'affinité sur membranes de tissu mammaire a permis de confirmer, d'une manière simple, le caractère mono ou bifonctionnel des hormones employées. Elle a démontré le caractère hybride de l'hormone lactogène placentaire ovine. Cette méthode permet également de repurifier des hormones partiellement dégradées lors de la préparation ou de la radioiodation. Cette technique ne permet cependant pas de préparer de grandes quantités d'hormone.

Lors des tests d'activités, les taux de liaison spécifique des diverses hormones témoins (prolactine ovine, bGH et hGH) sont comparables à ceux déjà obtenus (MARTAL & DJIANE, 1977, P_{14x}, DJIANE & DURAND, 1977). Mais ils sont nettement supérieurs pour les sites récepteurs lactogènes à ceux de SHIU & coll., 1973, et de POSNER & coll., 1974, en raison du prétraitement in vivo de désaturation des récepteurs par la bromocryptine (Chapitre I).

Le caractère bicéphale de l'oCS, vis-à-vis des sites récepteurs lactogènes et des sites récepteurs de croissance, rend cette molécule particulièrement intéressante du point de vue structural. Ces résultats suggèrent aussi que les autres hormones lactogènes placentaires de Ruminants sont de nature bifonctionnelle, en raison de leur capacité de se lier à la fois aux deux sortes de récepteurs membranaires (Fig. 1, Tableau I) dans les dosages radiorécepteurs. L'hormone lactogène placentaire humaine est bien capable de se lier aux sites récepteurs somatotropes, mais le taux de liaison est très faible (TSUSHIMA & FRIESEN, 1973) (Tableau I).

En raison de la très forte homologie structurale entre l'hCS et l'hGH, il est probable que la très grande différence de liaison de ces molécules aux sites récepteurs de croissance provienne des petites différences de conformation tertiaire, telles que nous les discuterons au chapitre V.

L'hormone de croissance humaine est la seule hormone de croissance, à la différence de celles d'autres espèces (ovine, bovine, équine) à être capable de se lier aux deux types de récepteurs, et à posséder, comme l'oCS, de puissantes activités lactogènes et somatotropes. L'ensemble des molécules de prolactines de Mammifères ne possèdent pas d'activité de croissance dans le test du tibia de Rat et ne se fixent pas aux sites récepteurs de croissance. Nous avons toutefois observé qu'à forte dose, la prolactine était capable d'inhiber la liaison de la bGH et surtout de l'oCS aux sites récepteurs de croissance. Ces résultats évoquent le comportement hybride des prolactines de Téléostéens que nous analyserons au chapitre V, et soulignent la limite de la conception de la spécificité fonctionnelle des sites récepteurs (Fig. 7 et 11).

CHAPITRE III

Principales propriétés

physicochimiques de l'oCS

Les diverses techniques de purification de l'hormone lactogène placentaire ovine font appel à un certain nombre de propriétés physicochimiques de cette protéine. En effet, les méthodes habituelles de préparation des protéines reposent essentiellement (si l'on exclut les nombreuses variantes de chromatographie d'affinité) sur la séparation des protéines selon leur taille, lors de filtration sur tamis moléculaire, et selon leurs charges électriques (résultant de leur composition en aminoacides basiques et acides), lors de chromatographie sur échangeurs d'ions.

Bien que l'activité biologique de l'oCS ait permis d'identifier cette hormone dans les divers éluats de filtration sur gel ou de chromatographie sur DEAE ou CM Séphadex, il est important de pouvoir caractériser cette protéine avec davantage de précision. Aussi avons-nous déterminé, à partir de préparations d'oCS hautement purifiées, d'une part, le Poids et la taille moléculaire de l'oCS et, d'autre part, son comportement électrophorétique et son point isoélectrique.

METHODES

A) DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE (P.M.) DE L'OCS

1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS (MARTAL & DJIANE, 1975, P_{8x}). Le procédé utilisé est celui de SHAPIRO & coll. (1967) légèrement modifié par FROMAGEOT & ZINDER (1968) et WEBER & OSBORN (1969).

Principe : La séparation des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide, en présence d'un détergent, le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), dépend seulement du poids moléculaire de ces protéines. Le détergent anionique annule toutes les différences de charges. Le champ électrique fournit la force d'entraînement des molécules. La vitesse de migration des protéines, dans un gel d'exclusion moléculaire contenant du SDS, n'est fonction que de la masse de l'ensemble monomérique polypeptide-SDS. Cette mobilité électrophorétique est proportionnelle au logarithme du poids moléculaire des protéines.

Techniquea) Préparation des solutions protéiques.

L'OCS purifiée et les protéines marqueuses de Poids Moléculaire (P.M.) connu : Sérualbumine, Ovalbumine, Myoglobine (SCHWARTZMANN, BECTON DICKINSON), inhibiteur trypsique du soja (CALBIOCHEM), prolactine ovine et hormone de croissance bovine (N.I.H.) sont diluées à la concentration de 1mg par ml dans du sérum physiologique (NaCl 9%) puis mélangées en quantités égales dans le tampon réducteur suivant : tampon phosphate de sodium 0,01 M, pH 7,2, SDS (2%), mercaptoéthanol (5%), urée 4 M et sucrose (5%).

Les protéines sont ensuite incubées dans ce tampon à 100°C pendant quelques minutes afin de réduire à l'état de monomères toutes les protéines analysées.

b) Préparation des gels. Pour réaliser des gels de polyacrylamide à 10%, les solutions suivantes sont préparées :

I : solution aqueuse d'acrylamide (40%) et de Bis-acrylamide (0,8%) (EASTMAN KODAK Co. 5521 et 8383).

II : solution de TEMED à 0,23% (EASTMAN KODAK Co. 8178) et de S.D.S. à 0,4% (SIGMA Chemical Co.) dans du tampon phosphate de sodium 0,4 M pH 7,2.

III : solution de persulfate d'ammonium à 0,14% (PROLABO)

Les solutions I, II, III sont mélangées dans le rapport 1/1/2 et versées dans des tubes de verre de 0,6 cm de diamètre interne et de 9 cm de longueur. Après avoir déposé 300 μ l environ d'eau distillée à la surface du mélange, le gel polymérise à la lumière naturelle en 30 à 60 mn. Le sommet du gel est ensuite rincé avec du tampon de migration et les gels sont placés dans l'appareil d'électrophorèse.

c) Dépôt des échantillons. Après réduction des protéines, 10 μ g de protéine (dans 20 μ l de tampon phosphate) sont dilués dans 20 μ l de sucrose (à 40%) et 60 μ l d'eau distillée. Enfin 5 μ l de Bleu de Bromophénol (0,5%) sont additionnés à chaque échantillon.

d) Migration des échantillons. Les deux réservoirs de l'appareil d'électrophorèse sont remplis avec du tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,2 contenant 0,1% de S.D.S. L'électrophorèse est réalisée à la température de la pièce à raison de 4 mA/gel pendant 20 mn, puis 10 mA/gel pendant environ 5 heures.

e) Coloration et décoloration. Après électrophorèse, les gels sont enlevés des tubes, leur longueur est mesurée ainsi que la distance de migration du Bleu de Bromophénol qui constitue, en raison de son très faible poids moléculaire, le front de migration. Son emplacement est marqué à la lame de rasoir par une petite entaille puis à l'encre de Chine. Les protéines sont fixées à l'acide trichloracétique (TCA) à 40% pendant au moins 3 heures. Les gels sont ensuite colorés pendant 2-3h au Bleu de Coomassie (2%) dissous dans un mélange de méthanol à 50% et d'acide acétique dans le rapport 9/1, puis filtré. Enfin les gels sont décolorés avec du méthanol et de l'acide acétique dilués (50 ml/70 ml/eau q.s.p. 1000 ml). La longueur des gels après décoloration et la distance de migration des bandes de protéines sont mesurées. La mobilité des protéines est calculée selon la relation :

$$= \frac{\text{distance de la migration protéique}}{\text{distance du front de migration}} \times \frac{\text{long. du gel avant coloration}}{\text{long. du gel après décoloration}}$$

Puis les mobilités des diverses protéines sont exprimées vis à vis des poids moléculaires connus sur une échelle semi-logarithmique.

2. Chromatographie d'exclusion moléculaire

Principe : Cette méthode est encore appelée gel filtration moléculaire. C'est l'une des méthodes les plus efficaces et les plus utiles pour séparer les protéines les unes des autres par leur poids et leur taille. Les gels habituellement utilisés : Séphadex (dextranes), Biogel (polyacrylamide) ou Ultrogel (mélange d'Acrylamide et d'Agarose) constituent de véritables tamis moléculaires. Les très grosses molécules protéiques sont "exclues" du gel. Les autres protéines, de différentes tailles moléculaires, pénètrent plus ou moins dans les pores internes des billes de gel et traversent ainsi la colonne à différentes vitesses. Les

très grosses molécules définissent le volume d'exclusion de la colonne ou volume mort qui correspond au volume de la phase aqueuse de la colonne (V_o). Le volume d'élution des protéines globulaires (V_e) est approximativement une fonction linéaire du logarithme de leur poids moléculaire (ANDREWS, 1964, 1965).

Pour caractériser le comportement des protéines sans référence aux dimensions géométriques de la colonne de gel, les rapports $\frac{V_e}{V_o}$ et $K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$ sont utilisés.

V_e représente le volume d'élution de la protéine, V_o le volume mort ou volume vide, V_t le volume du gel, et K_{av} est le coefficient de partage de la substance entre la phase liquide et la phase gel. Ce dernier paramètre est indépendant de la compacité du gel à l'inverse de $\frac{V_e}{V_o}$.

Technique :

Une colonne d'Ultrogel (LKB) AcA 54 est employée (1,5 x 90 cm) (Fig. 24). Elle est équilibrée dans du tampon bicarbonate d'ammonium 25 mM, KCl 0,4 M (MARTAL & DJIANE, 1975, P_{8x}). Le volume mort de la colonne est déterminé avec du bleu Dextran 2 000 dont le P.M. est de 2 000 000 de daltons. Les marqueurs protéiques suivants sont utilisés :

- Sérumalbumine bovine (fraction V de Cohn , SIGMA Chemical Co.) de P.M. 67 000 d'après PHELPS & PUTNAM (1960).
- Ovalbumine cristallisée (SIGMA Chemical Co.) de P.M. 45 000 (WARNER, 1954).
- β lactoglobuline cristalline (SIGMA Chemical Co.) de P.M. 36 500 (GORDON & coll. 1961).
- Chymotrypsinogène cristallisé (SIGMA Chemical Co.) de P.M. 25 000 (WILCOX & coll. 1957).
- Inhibiteur tryptique du soja (CALBIOCHEM) de P.M. 21 500 (WU & SCHERAGA, 1962).

- Myoglobine cristallisée (SIGMA Chemical Co.)
de P.M. 17 800 (EDMUNDSON & HIRS, 1962).

- hormone de croissance bovine (PENTEX) de P.M.
22 000 (ANDREWS, 1966, ELLIS, 1966).

A la différence des gels de dextranes, le mélange agarose/acrylamide permet des pressions de travail élevées grâce à l'agarose, sans présenter une réduction du volume vide. Les résultats peuvent donc être indifféremment exprimés en utilisant les deux paramètres $\frac{V_e}{V_o}$ et K_{av} . Ces coefficients dépendent évidemment du gel utilisé bien qu'ils soient propres à chaque protéine.

La taille moléculaire de l'oCS peut être calculée à partir des paramètres précédents grâce à la méthode de SIEGEL & MONTY (1964). En effet, les colonnes d'exclusion moléculaire mesurent non pas le poids moléculaire vrai d'une protéine inconnue, mais son rayon de Stokes qui est défini très simplement comme le rayon d'une sphère parfaite non hydratée possédant la même vitesse de passage à travers la colonne que la protéine inconnue. Si la protéine inconnue et les protéines marqueuses sont sphériques, la méthode fournit directement le poids moléculaire d'une part, et d'autre part le rayon de Stokes est proportionnel à $(-\log K_{av})^{1/2}$. Un certain nombre de valeurs de rayon de Stokes sont rassemblées par LAURENT & KILLANDER (1964). Enfin la taille moléculaire des protéines est exprimée par le diamètre de ces protéines qui sont considérées comme approximativement globulaires.

B) COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE DE L'OCS

Il est étudié sur gel de polyacrylamide, selon la méthode d'ORNSTEIN (1964) et DAVIES (1964). Cette technique a été employée pour analyser l'homogénéité des préparations de l'OCS, mais elle permet également de caractériser la charge électrique de cette protéine.

Principe : La séparation de protéines selon leur charge électrique dépend en fin de compte de leurs propriétés acido-basiques qui résultent du nombre et de la nature des chaînes latérales ionisables de leur chaîne polypeptidique. L'électrophorèse de zone en gel de polyacrylamide ou électrophorèse en disques présente un pouvoir de résolution nettement plus élevé que l'électrophorèse de zone sur papier. En effet, le support en gel de polyacrylamide permet de séparer les molécules protéiques selon leur taille moléculaire, ce qui conjugue les propriétés de l'électrophorèse à celles de la chromatographie d'exclusion moléculaire. Enfin le pouvoir de résolution est encore amélioré par la méthode d'électrophorèse discontinue utilisée ici. Deux sortes de gel à porosité et pH différents sont utilisés. Les protéines analysées migrent alors dans un gel retardateur à gros pores (gel de dépôt), puis dans un gel à petits pores (gel de migration).

Technique

a) Préparation des gels. Les solutions suivantes sont préparées selon DAVIES (1964).

A. HCl (1 N).....	48 ml
TRIS [*] (MERCK).....	35,6 g
TEMED [*] (EASTMAN KODAK Co. 8178).....	0,23 ml
eau.....	q.s.p. 100 ml
(pH 8,9)	

B. HCl (1 N)..... 48 ml
 TRIS..... 5,98 g
 TEMED..... 0,46 ml
 eau..... q.s.p. 100 ml
 (pH 6,7)

C. Acrylamide (EASTMAN KODAK Co. 5521)..... 30 g
 BIS acrylamide(EASTMAN KODAK Co. 8383)... 0,8 g
 eau..... q.s.p. 100 ml
 (gel à 7,5%)

D. Acrylamide..... 10 g
 BIS acrylamide..... 2,5 g
 eau..... q.s.p. 100 ml

E. Riboflavine (EASTMAN KODAK Co. 5181)..... 4 mg
 eau..... q.s.p. 100 ml

F. Sucrose (ANALAR) 40 g
 eau..... q.s.p. 100 ml

G. Persulfate d'ammonium $[S_2O_8(NH_4)_2]$ 140 mg
 (PROLABO)
 eau..... q.s.p. 100 ml

A partir des solutions précédentes, le gel de dépôt est préparé extemporanément selon le mélange suivant : B(1 partie), D(2 parties), E(1 partie), F(4 parties).

Le gel de migration est composé du mélange en quantité égale de la solution A C : A(1 partie), C(2 parties) et eau distillée(1 partie) et de la solution G (4 parties). Le gel de migration est d'abord versé dans les tubes, dégazé avec une pipette, et recouvert d'un petit film d'eau pour éviter toute rétraction du gel.

La photopolymérisation est réalisée en 30 à 45 mn.

Le gel de dépôt est ensuite versé après avoir enlevé l'eau très délicatement avec un papier filtre. Ce gel est recouvert à son tour d'un peu d'eau et la photopolymérisation a lieu en 10 mn environ.

b) Electrophorèse : L'eau qui recouvre le gel de dépôt est aspirée et remplacée par du tampon Tris-Glycine, pH 9,6. Les tubes sont placés dans l'appareil. Le tampon précédent est versé dans la cuve supérieure. La cuve inférieure est remplie de tampon Tris-HCl, pH 8,8. L'appareil est placé à 0°C. Les échantillons de protéines (environ 50 à 150 μg dans 80 μl de tampon Tris-Glycine, pH 9,6) sont déposés délicatement en haut du gel de dépôt, en présence de 20 μl de sucrose à 40% et de 5 μl de Bleu de Bromophénol à 0,5%. Le courant électrique est appliqué à raison de 1 mA/tube pendant environ 15 mn, puis de 2 mA/tube. Après une migration convenable du front de migration, l'électrophorèse est arrêtée.

c) Coloration et décoloration : Les gels sont sortis des tubes à l'aide d'une seringue remplie d'eau et d'une aiguille fine. La coloration des protéines est réalisée à l'Amidoschwartz (1%) dans de l'acide acétique à 7% pendant 45 mn. Les gels sont ensuite décolorés à l'acide acétique à 7% dans des bacs adéquats, pendant plusieurs jours. La décoloration électrique par électrophorèse en présence d'acide acétique à 7%, quoique plus rapide, est évitée lors des déterminations de R_f , car elle provoque des déformations des bandes.

d) Expression des résultats : La mobilité électrophorétique d'une protéine est exprimée par son R_f qui est le rapport entre la migration de la protéine et celle du front de migration, corrigé par un rapport tenant compte de la rétraction du gel (avant et après coloration et décoloration)

C. DETERMINATION DU POINT ISOELECTRIQUE DE L'OCS

Le point isoélectrique, pI, d'une protéine peut être défini comme la valeur du pH d'une solution dans laquelle la charge électrique nette de la protéine est nulle. La méthode d'analyse utilisée ici pour déterminer le pI de l'OCS est l'électrofocalisation ou focalisation isoélectrique.

Principe

C'est un processus d'électrophorèse, inventé en Suède par SVENSSON en 1962, qui consiste à séparer des protéines en établissant un champ électrique à travers un gradient de pH. Chaque protéine migre et se localise dans la portion du gradient correspondant à son pH isoélectrique. Le pouvoir de résolution de cette technique est très supérieur à celui de toutes les autres méthodes d'électrophorèse.

Dans l'électrofocalisation, la migration des protéines est stabilisée par un gradient de pH constitué par un gradient d'Ampholines dont la constitution est sous licence LKB. On sait néanmoins d'une part, que les Ampholines sont des substances de petits poids moléculaires donc dialysables, et d'autre part, qu'ils sont composés de chaînes aliphatiques polyaminées et polycarboxyliques. Ces Ampholines (LKB) présentent de petites différences de point isoélectrique (approximativement 0,02 unité) favorables à une bonne distribution de l'échelle de pH, lorsque la tension est établie. Les protéines de l'échantillon analysé sont ajoutées à ce système de focalisation isoélectrique et migrent en même temps que les Ampholines. Pour que le pH des protéines n'intervienne pas, il est nécessaire que les Ampholines soient à une concentration suffisante (au moins 1%) afin de présenter une grande

capacité tampon. Pour éviter les courants de convection obligatoires dans une colonne de liquide soumise à un champ électrique, un gradient de densité est réalisé à l'aide de sucre mélangé à la solution d'Ampholines, selon la méthode de KOLIN (1955).

Technique

1. Colonne d'électrofocalisation :

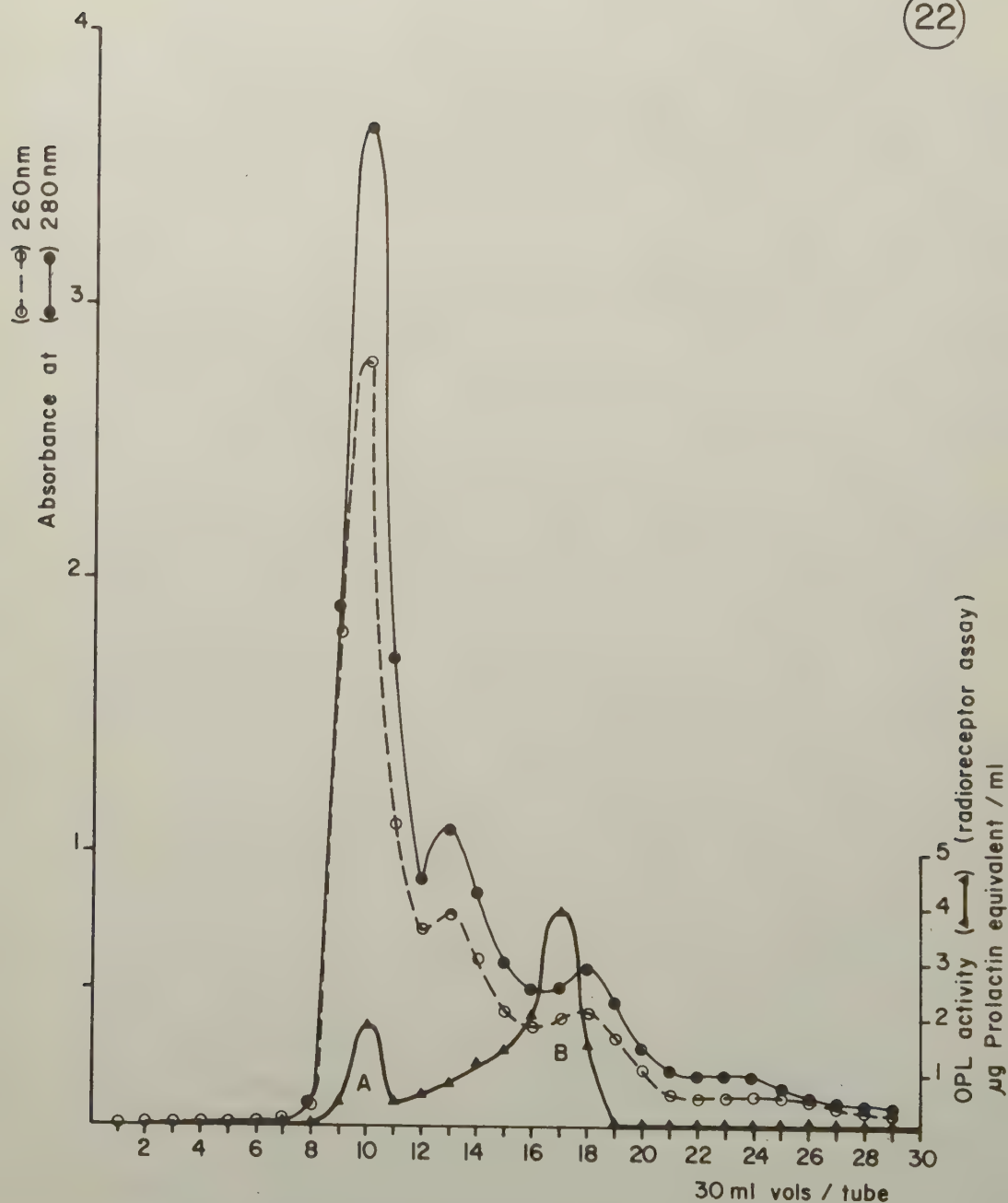
Une colonne LKB 8 102, de 62 x 7,7 cm de dimension, et de 440 ml de capacité est employée. Il s'agit d'un équipement identique à celui de SVENSSON (1962). La colonne est en verre et entourée d'une jaquette de refroidissement. Les électrodes sont en fil de platine. Dans l'axe de la colonne passe un tube contenant la cathode. L'anode est en position supérieure. Cette colonne peut supporter une tension maximale de 1 200 Volts.

2. Solutions d'électrodes : Pour protéger les Ampholines localisées près des électrodes, d'une oxydation anodique ou d'une réduction cathodique, les solutions suivantes d'électrodes sont utilisées :

Pour la cathode, en bas de la colonne, 48 g de sucre sont dissous dans 1,6 ml d'éthanolamine diluée dans 56 ml d'eau distillée.

Pour l'anode, 0,4 ml d'acide sulfurique est dilué dans 40 ml d'eau distillée.

3. Gradient de densité : Un gradient de densité linéaire est préparé avec une solution concentrée contenant 100 g de sucre dissous dans 150 ml d'eau bidistillée. Une quantité de 7,5 ml d'Ampholine de gamme de pH 3 à 10 ou 5 à 8 (solution standard à 40%) est ajoutée dans le vase A contenant la solution concentrée. La solution diluée ne comprend pas de sucre mais seulement de l'eau bidistillée et 2,5 ml d'Ampholines. Les deux vases sont ajustés à 220 ml, et l'agi-



Purification du matériel précipité au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par filtration sur une colonne de Séphadex G100 (4 x 100cm) équilibrée avec du tampon bicarbonate d'ammonium.

tateur est placé dans le vase A ainsi que le tube de descente du gradient.

4. Echantillons d'oCS : Plusieurs lots d'oCS d'environ 50 mg chacun, provenant d'effluents d'une colonne préparative de Séphadex G100 équilibrée avec du tampon bicarbonate d'ammonium 25 mM furent analysés (Fig. 22) (MARTAL & DJIANE, 1975, P_{8x}). Les échantillons ont été dialysés, lyophilisés, puis dissous dans 4 ml d'eau distillée. L'échantillon est ajouté au vase A après qu'un quart de gradient de densité ait été introduit dans la colonne. De cette façon, l'échantillon n'entre pas en contact avec l'électrode inférieure, et sa concentration à l'électrode supérieure est nulle. Cette méthode d'addition des échantillons évite donc leur dégradation.

5. Remplissage de la colonne : Il se fait en chambre froide à 4°C. La solution dense de la cathode est transférée dans le tube central à l'aide d'une pompe péristaltique et d'un tube capillaire. Le gradient de densité est introduit progressivement avec une pompe à un débit de 3 ml/mn. La solution sans sucrose de l'anode est transférée dans le compartiment d'électrofocalisation supérieur au même débit. La verticalité rigoureuse de la colonne est vérifiée ainsi que la bonne marche du circuit de refroidissement.

6. Gradient de pH : Lorsque la tension est établie, la migration des Ampholines constitue progressivement un gradient de pH croissant depuis le haut de la colonne. Il est d'abord appliqué une tension de 400 Volts pendant 2 à 3 heures, puis de 800 Volts pendant 48 heures. L'augmentation de la résistance de la colonne est repérable par la chute de l'intensité mesurée par le milliampèremètre du générateur (DESAGA).

Les surchauffes locales sont contrôlables car elles provoquent des déformations du gradient de densité. Elles sont identifiables par des remous de zones lors d'éclairage latéral de la colonne. Si celles-ci se produisent, la tension est alors diminuée ou même coupée momentanément.

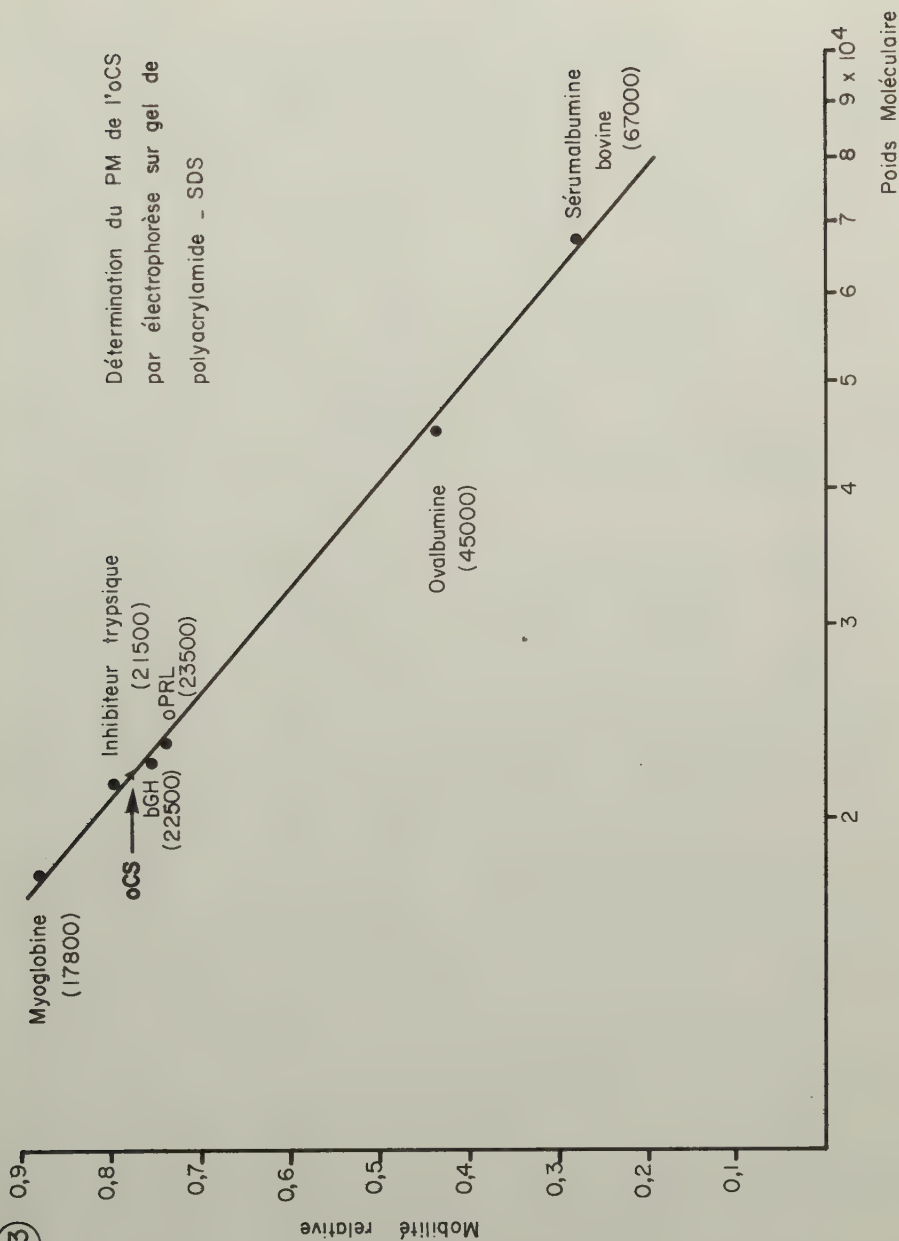
Lorsque le courant qui traverse la colonne est pratiquement constant, l'électrofocalisation peut être arrêtée. La tension est alors égale à environ 1 000 V. Les ions constitués par les Ampholines et les protéines se sont alors stabilisés.

Cette étape de 48 h environ de focalisation est une période particulièrement dangereuse en raison des tensions appliquées qui sont mortelles.

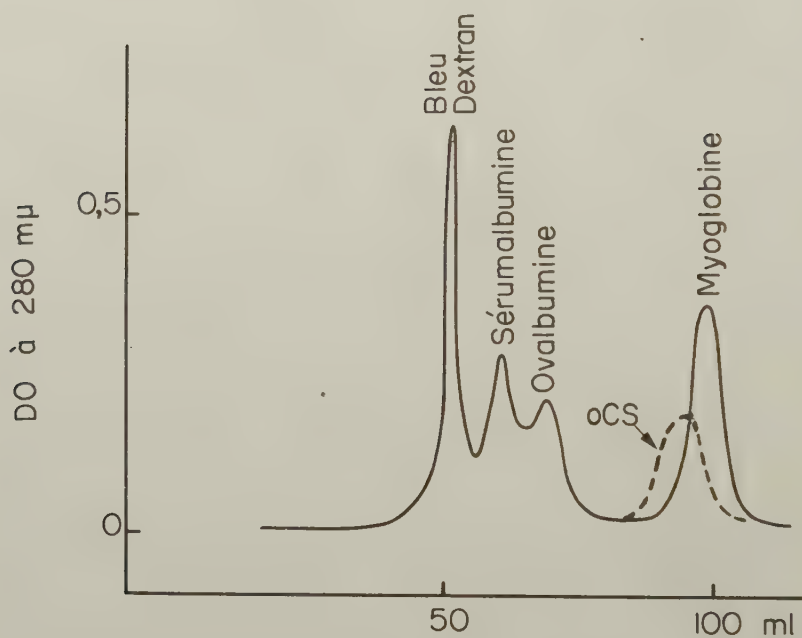
7. Vidange de la colonne : Le courant est coupé et la valve du bas de la colonne est fermée afin d'éviter, lors de l'élution, le mélange de la solution d'électrode au gradient. La solution d'électrode (cathode) du tube central est aspirée au moyen d'une pompe péristaltique. La colonne est ensuite éluée au débit de 80 ml/h. Un absorptiomètre ISCO à flux continu permet de détecter les protéines de l'effluent à 280 nm. L'absorption des Ampholines est particulièrement faible à cette longueur d'onde, alors que celle des protéines est maximum. Des fractions de 5 ml sont recueillies dans un collecteur (GILSON). Les tubes sont conservés bouchés afin que le gaz carbonique de l'air ne modifie pas le pH des fractions alcalines.

8. Détermination des pI et localisation de l'oCS
La mesure des valeurs pH des fractions est effectuée à l'aide d'un pH-mètre dans la chambre froide. Les fractions sont ensuite dialysées pour éliminer les Ampholines et le sucrose. Des prises d'essai sont effectuées pour doser l'activité biologique en dosage radiorécepteur. Enfin, les divers pics d'électrofocalisation sont analysés en électrophorèse en gel de polyacrylamide (Fig. 29).

23



24 Filtration comparée de divers protéines
sur Ultrogel AcA 5_4



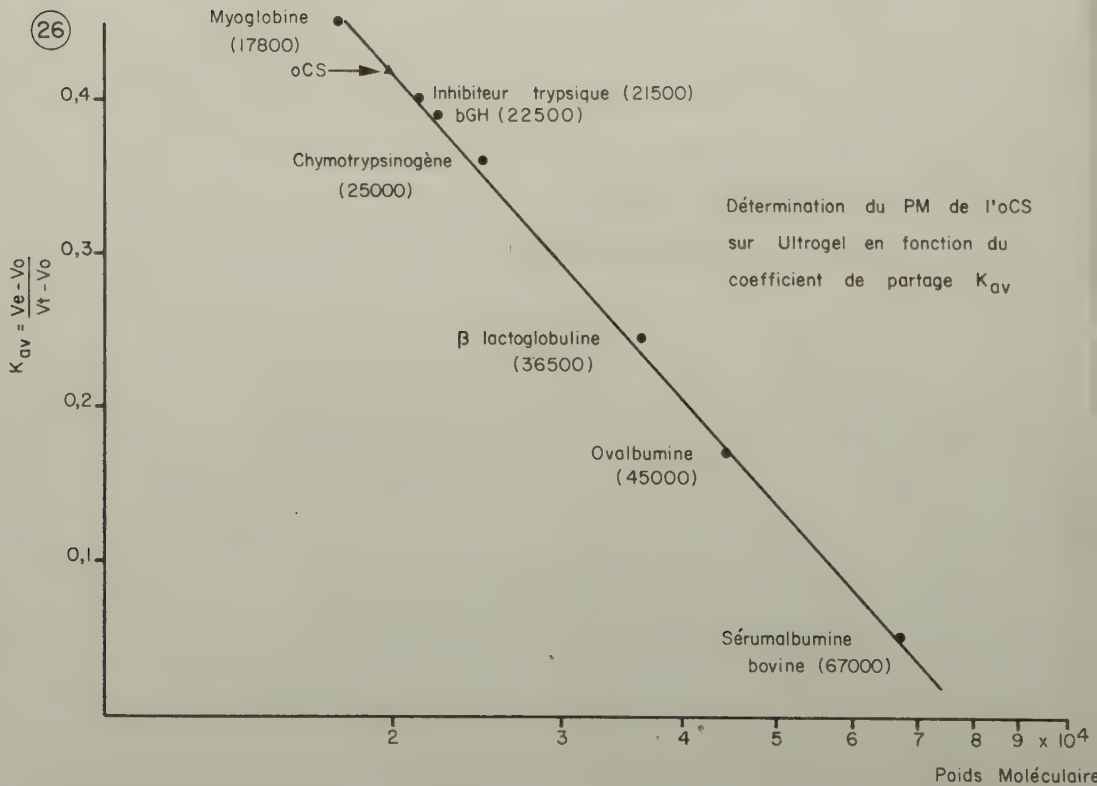
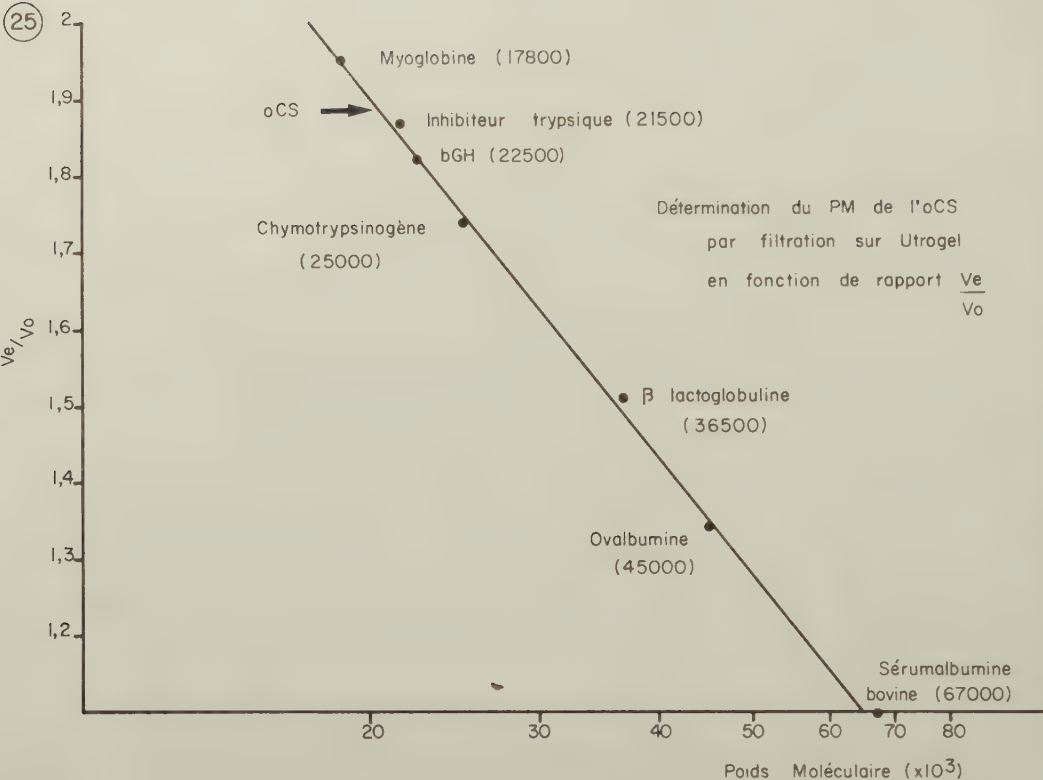
RESULTATS

1. Poids et taille moléculaire de l'oCS

(MARTAL & DJIANE, 1975, P_{8x})

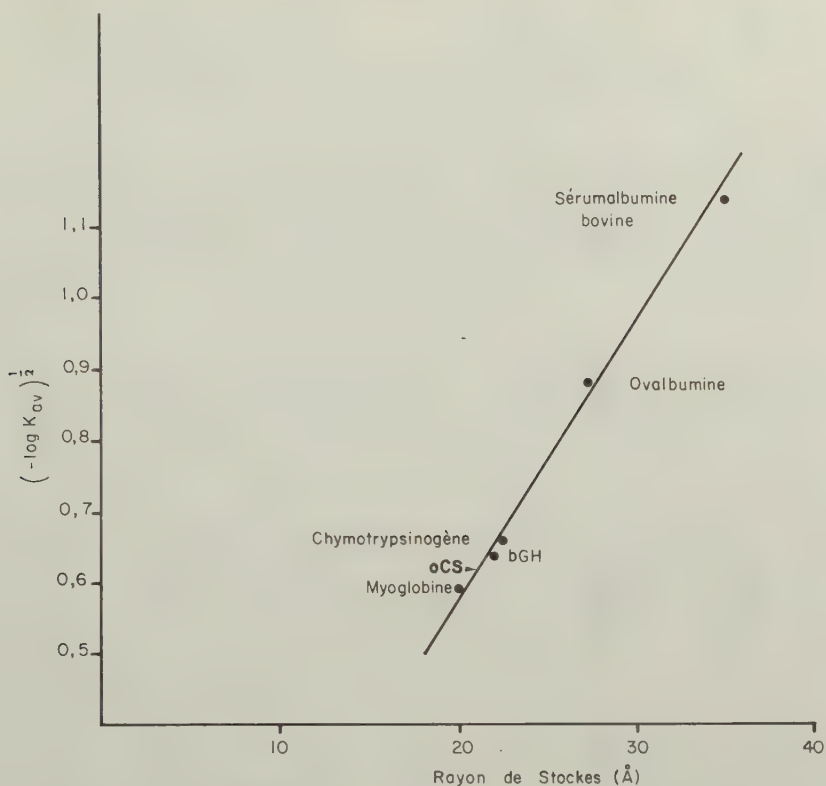
Les résultats de l'analyse de l'oCS par la méthode d'électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS sont présentés Fig. 23. Celle-ci montre, en échelle semi-logarithmique, la proportionnalité entre la mobilité électrophorétique des divers marqueurs protéiques (Myoglobine, Inhibiteur trypsique, bGH, oPRL, Ovalbumine, Sérumalbumine bovine) et leur Poids Moléculaire (P.M.). D'après cette courbe de référence, le P.M. apparent de l'oCS est estimé à environ 22 000 daltons.

Les résultats de la méthode de chromatographie d'exclusion moléculaire sont rapportés sur les Fig. 24 - 26 . Lorsque le P.M. des marqueurs protéiques (Myoglobine, Inhibiteur trypsique, bGH, Chymotrypsinogène, β lactoglobuline, Ovalbumine, Sérumalbumine bovine) est exprimé en échelle sémi-logarithmique en fonction du rapport $\frac{V_e}{V_o}$ ou du coefficient de partage K_{av} , le P.M. apparent de l'oCS est d'environ 20 000 daltons. Si l'oCS est assimilée à une protéine sphérique, son rayon moléculaire apparent est de 21 Å (Fig. 27),



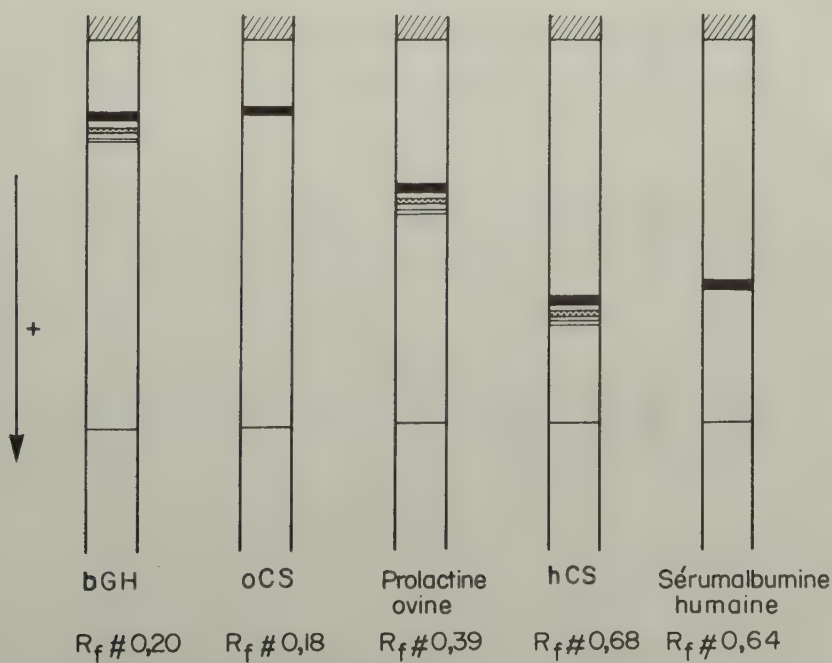
(27)

Détermination du Rayon moléculaire apparent de l'oCS

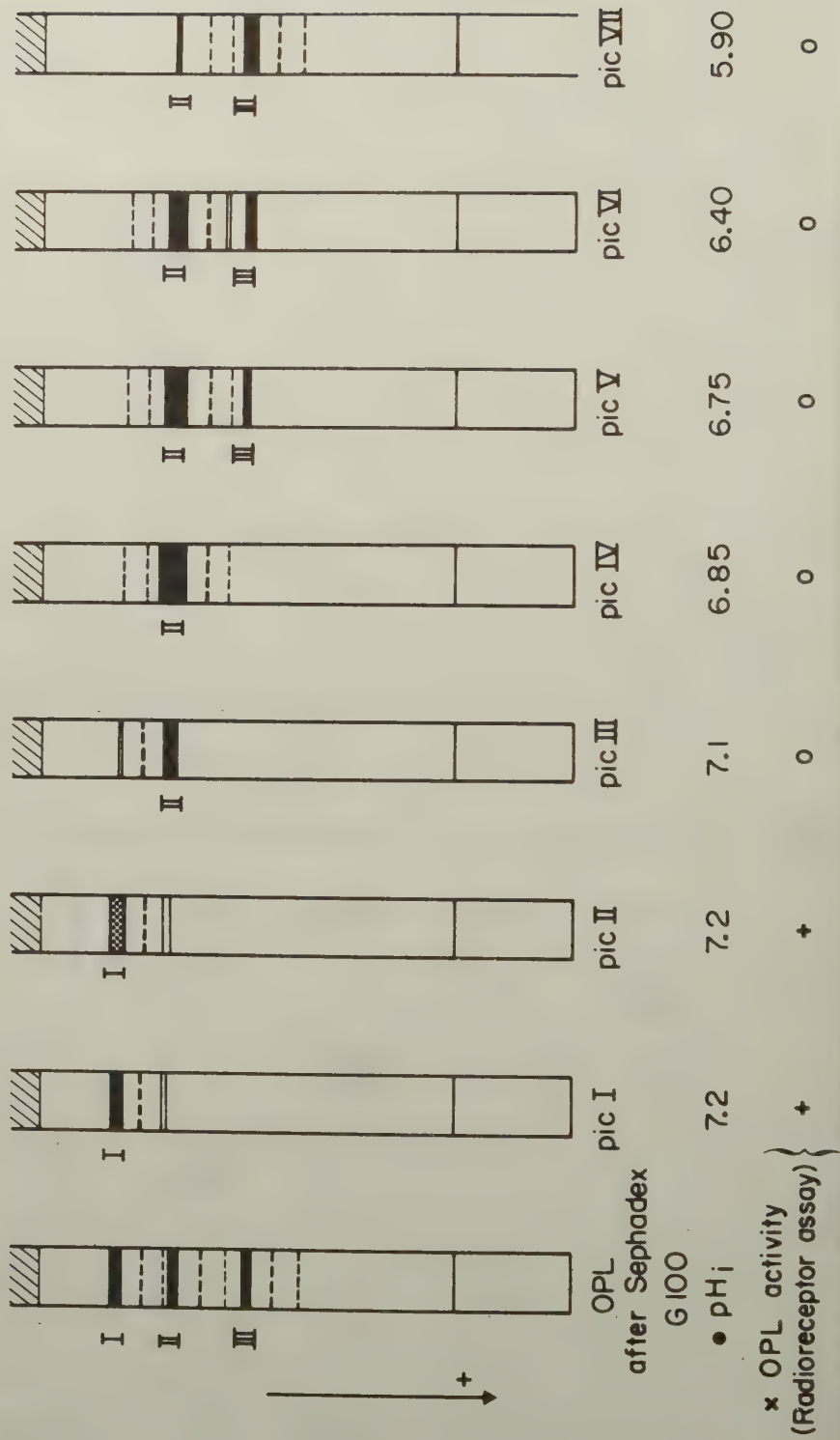


(28)

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (méthode Ornstein-Davis)



Analyse par électrophorèse en disques des fractions obtenues par focalisation isoélectrique.



2. Comportement électrophorétique de l'oCS

La Fig. 28 présente différents profils électrophorétiques à pH 9,6 de Somatomammotrophines ovine (oCS) et humaine (hCS), d'hormone de croissance bovine (bGH), de prolactine ovine (oPRL) et de sérumalbumine humaine.

Les bandes majeures d'oCS et de bGH migrent avec une mobilité identique et plus lentement que l'oPRL et l'hCS. Les R_f des bandes majeures de l'oCS, de la bGH, de l'oPRL, de la sérumalbumine humaine et de l'hCS sont respectivement : 0,18 ; 0,20 ; 0,39 ; 0,64 et 0,68. Lorsqu'une grande quantité d'oCS est déposée sur les gels de polyacrylamide, un profil d'isohormones est observé (Fig. 29, pics I et II), identique à ceux de l'hCS, de la bGH et de l'oPRL (Fig. 28).

3. Point isoélectrique apparent de l'oCS

Lorsque le matériel du pic B' (Fig. 22) est étudié par la méthode de focalisation isoélectrique, l'activité lactogène, retrouvée après dialyse des fractions, est localisée dans les pics I et II (Fig. 29). L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide (Fig. 29) montre que ces pics présentent un profil identique. Ils ne diffèrent que par la concentration respective des isohormones. La bande majeure de ces pics montre, sans ambiguïté, la même mobilité électrophorétique que l'oCS purifiée (Fig. 28). Après électrofocalisation, le point isoélectrique apparent, pI, de l'oCS est donc de 7,2 (Fig. 29).

Tableau VI

Poids moléculaires comparés des hormones lactogènes placentaires

Méthodes d'analyse HORMONES LACTOGENES PLACENTAIRES	Filtration sur gel	Electrophorèse en S.D.S.	Composition en aminoacides	Equilibre de sédimentation	AUTEURS
FEMME (hcs)	30 000 37 000		21 500	39 000 38 000 18 600*	FRIESEN (1965) CATI & coll. (1967) FLORINI & coll. (1966) FLORINI & coll. (1966)
SINGE (mcs)	28 000 - 29 000	21 000 21 000 - 22 000	21 500		SHOWE & FRIESEN (1971) VINIK & coll. (1973)
BREBIS (ocs)	19 000 - 22 000 22 000	20 000 - 22 000 22 500	21 400 22 000		MARTAL & DJIANE (1975) CHAN & coll. (1976) HURLEY & coll. (1977) FELLOWS & coll. (1976)
VACHE (bcs)	22 150*		22 000		BOLANDER & FELLOWS (1976)
CHEVRE (ecs)	22 000				BECKA & coll. (1977) CURRIE & coll. (1977)
RATTE (rcm)	18 000	22 000			ROBERTSON & FRIESEN (1975)
LAPINE (rcs)		24 200	22 100	20 600	BOLANDER & FELLOWS (1976)

* en présence de Guanidine (5-6 M)

DISCUSSION

Le Poids Moléculaire apparent de l'oCS, déterminé par les méthodes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS et de chromatographie d'exclusion moléculaire, est estimé à 20 000-22 000 daltons.

Ces résultats (MARTAL & DJIANE, 1975, P_{Ex}) sont analogues à ceux de CHAN & coll. (1976) et d'HURLEY & coll. (1977). Par l'analyse de la composition en aminoacides, FELLOWS & coll. (1976) et HURLEY & coll. (1977) confirment également les résultats des méthodes d'électrophorèse en SDS et de filtration moléculaire sur gel (Tableau VI).

Lorsque nous n'employons pas de force ionique élevée en chromatographie d'exclusion moléculaire, ou lorsque la réduction est insuffisante avant l'électrophorèse en SDS, la molécule d'oCS a tendance à s'agréger en dimères actifs biologiquement (Fig. 3). Le P.M. de l'oCS est donc très comparable à celui des monomères de la bGH (ANDREWS, 1966, ELLIS & coll. 1966) ou de l'hCS (CATT & coll. 1967) (tableau IV).

Il est intéressant de noter que le P.M. de la bGH a longtemps été estimé à 45 000 (LI & PEDERSEN, 1953) avant qu'ANDREWS (1966) et ELLIS & coll. (1966) proposent un P.M. de 22 000.

Les Poids Moléculaires comparés des hormones lactogènes placentaires selon les espèces sont résumés dans le Tableau VI ci-contre. Ils ont été déterminés par diverses méthodes, mais l'ensemble des auteurs retrouve des valeurs voisines du monomère d'hCS.

Le Poids Moléculaire (P.M.) de l'hCS a d'abord été estimé à 30 000 (FRIESEN, 1965) et à 37 500 (CATT & coll. 1967) par filtration sur gel Séphadex G 100. Par la méthode d'YPHANTIS (1960) d'ultracentrifugation et de sédimentation à l'équilibre, FLORINI & coll. (1966) trouvèrent une protéine homogène de 30 000 daltons. Quand ces mesures furent faites en présence de guanidine (5 M) avec ou sans mercaptoéthanol (2%) une valeur de 18 600 fut obtenue, ce qui suggère que l'hCS se présentait sous forme de dimères unis par des liaisons hydrophobes sans ponts disulfure. CATT & coll. (1967) trouvèrent également un PM de 39 000, mais détectèrent une hétérogénéité par la même méthode d'ultracentrifugation bien que la préparation d'hCS apparaissait homogène en électrophorèse en gels de polyacrylamide. Ces auteurs calculèrent, à partir des données d'analyse quantitative de composition en acides aminés, un PM de 21 500, ce qui correspond grosso modo aux études d'ultracentrifugation d'hCS en présence de guanidine. L'hCS apparaît donc comme une molécule d'une seule chaîne polypeptidique de PM d'environ 21 500, sujette à s'associer sous la forme de dimères.

Dans les conditions physiologiques normales, l'hCS est également présente en petite quantité (environ 3%) sous la forme d'agrégats de gros poids moléculaire (45 000, HAMBLEY & GRANT, 1972), dans le sérum et les extraits placentaires. SCHNEIDER & coll. (1975 a,b) démontrèrent par traitement au mercaptoéthanol que cette forme ("big hCS") est réductible en monomères d'environ

23 000 daltons. En réalité, les dimères d'hCS sont de deux sortes, les formes stables à liaison covalente, et les formes instables, réductibles par des agents dénaturants tels que l'urée, la guanidine ou le thiocyanate. La forme stable est nettement la plus abondante (SCHNEIDER & coll., 1977). Des formes dimériques analogues à l'hCS ont d'ailleurs été décrites pour d'autres hormones telles que l'hGH (GOODMAN & coll., 1972, GORDEN & coll., 1973, SINGH & coll., 1975, BENVENISTE & coll., 1975) ou la prolactine humaine (SUH & FRANTZ, 1974, ROGOL & ROSEN, 1974). Dans certaines conditions pathologiques comme des tumeurs hypophysaires, les formes dimériques augmentent considérablement (GUYDA & coll., 1975).

Comme le P.M., le Rayon de Stokes apparent de de l'oCS (21 Å) est comparable à ceux des hormones de croissance et des Somatomammotrophines chorioniques. En effet, le Rayon de Stokes de l'hGH et celui de la Somatomammotrophine chorionique de Singe (mCS) ont été estimés à 22 Å et 22,3 Å par VINIK & coll. (1973). SHOME & FRIESEN (1971) trouvèrent comme Rayon de Stokes pour l'hGH, la mCS et l'hCS, les valeurs de 23 Å, 23,8 Å respectivement.

Il peut être utile de comparer la taille moléculaire de l'oCS (42 Å) à celle d'autres molécules biologiques : la taille d'une molécule de glucose est estimée à 7 Å, celle de la Myoglobine qui est considérée être une petite protéine, à 36 Å, celle de la sérumalbumine bovine à 70 Å, celle d'une yglobuline à 111 Å. Par comparaison, la taille du virus de la mosaïque du tabac (P.M. : 40 000 000 daltons) est de 3 000 Å, celle d'une mitochondrie de cellule hépatique est de 15 000 Å, soit 1,5 μ et celle d'un hépatocyte d'environ 20 μ (LEHNINGER, 1977).

Tableau VII

Comparaison de la composition en aminoacides de diverses hormones et de leur Archétype hypothétique

	hGH	oGH	tGH	Archétype* GH	hPRL	oPRL	tPRL	Archétype* PRL	hCS	oCS	bCS	Archétype* CS	A*
Lys	9	11	8	10	10	9	9	8	9	14	12	9	11
His	3	3	5	4	9	8	5	9	7	4	4	6	5
Arg	11	13	11	13	12	11	7	13	11	10	9	11	12
Asn	9	16	19	6	11	22	19	12	7	19	21	7	10
Asp	11	12	12	11	9	20	12	9	15	22	11-12	15	12
Thr	10	12	21	8	10	9	21	7	12	10	20	12	12
Ser	18	13	21	17	16	15	17	14	18	15	21	18	16
Glu	13	24	29	15	17	22	17	16	13	25	21	12	17
Gln	14	6	7	11	9	26	11	9	12	24	21	14	14
Pro	8	10	7	7	8	11	11	9	5	10	11-12	6	7
Gly	8	15	7	7	7	11	8	8	7	15	19	8	7
Ala	7	4	8	12	11	9	10	11	6	13	16	6	9
Cys	4	4	4	4	6	6	4	6	4	6	6	6	6
Val	7	6	6	9	10	10	7	9	7	12	9-10	7	8
Met	3	4	1	5	3	7	5	5	6	5	3	4	3
Ile	8	7	9	7	13	11	9	13	7	10	5	9	11
Leu	26	27	27	25	23	23	24	27	25	13	14	26	27
Tyr	8	6	7	7	6	7	3	7	8	4	6	7	5
Phe	13	13	7	14	6	6	5	5	11	7	6	11	13
Trp	1	1	1	1	2	2	1	2	1	2	2	2	2
N-terminal	Phe	Phe	Ile	Phe	Leu	Thr	Val	variable	Val	-	-	variable	Ile
C-terminal	Phe	Phe	Leu	Phe	Cys	Cys	Cys	Cys	Phe	-	Phe	Phe	Phe
Nb de résidus	191	191	189	193	198	199	177	199	191	193	195-199	191-200	207
Identité avec l'Archétype	79%	86%	-	-	86%	86%	-	-	91%	-	-	-	-

* quand plusieurs hypothèses étaient envisagées dans la séquence des archétypes, seule la première a été considérée.

x A : Archétype de la Superfamille des GH, PRL et CS.

Le comportement de l'oCS en électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Fig. 28) montre que cette protéine est faiblement acide. En effet, à pH alcalin, sa migration vers l'anode est lente et identique à celle des hormones de croissance de Ruminants. D'après HURLEY & coll. (1977), l'oCS possède 24 aminoacides basiques (Arginine + Lysine), si l'on exclut l'Histidine qui est faiblement basique (Tableaux VII et VIII). Le nombre d'acides aminés dicarboxyliques n'est pas connu pour l'oCS. Il est de 23 (Acide aspartique + Acide glutamique) pour la bGH et de 24 pour l'oGH. En revanche, l'hCS, qui est l'hormone étudiée (Fig. 28) migrant le plus rapidement, possède 28 acides aminés dicarboxyliques (Asp+Glu). Cette migration rapide vers l'anode peut donc être expliquée par ses propriétés acido-basiques. L'hCS ne possède que 20 aminoacides basiques (Arg + Lys) (Tableau VIII). L'hGH, dont le R_f est égal à environ 0,58, migre plus rapidement que l'oGH dont le R_f apparent est de 0,20. Ces deux hormones de croissance ne diffèrent pourtant pas par le nombre d'acides aminés acides ni par leur Poids Moléculaire, mais par leurs aminoacides basiques (20 Arg + Lys pour l'hGH et 24 pour l'oGH). Malgré le pH alcalin du tampon d'électrophorèse, cette différence d'acides aminés basiques peut expliquer la différence de comportement électrophorétique de ces deux hormones.

D'après le tableau VIII, la prolactine ovine présente à la fois une vitesse de migration électrophorétique nettement inférieure (R_f de 0,39) à celle de l'hormone de croissance humaine (R_f de 0,58) tout en présentant une composition en acides aminés acides et basiques presque identique. En raison de la capacité de tamis moléculaire des gels de polyacrylamide, la différence de R_f de ces deux protéines peut résulter de leur différence de Poids Moléculaire puisque la chaîne polypeptidique de prolactine ovine possède 199 aminoacides et celle de l'hGH 191.

Comparaison de la mobilité électrophorétique et de la charge

	R_f	Nombres d'acides aminés		Nombre total d'acides aminés
		acides (Asp, Glu)	basiques (Arg, Lys)	
hCS	0,58	28	20	191
hGH	0,58	24	20	191
oPRL	0,39	25	20	199
oGH	0,20	24	24	191
bGH	0,20	25	24	191
oCS	0,18	(?)	24	195

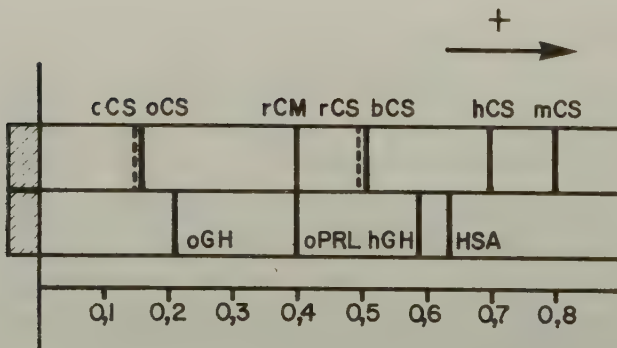
(30)

Echelle des

mobilités électrophorétiques comparées

des hormones lactogènes placentaires

(à pH alcalin)



Enfin, les différentes bandes d'isohormones observées (Fig. 28 et pic I de la Fig. 29) peuvent résulter de désamidations telles que SHERWOOD (1967) l'a montré pour l'hCS.

La mobilité électrophorétique comparée des hormones lactogènes placentaires, analysée en électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH alcalin (pH 9,6), est schématisée sur la Fig. 30.

Par ordre décroissant de leur mobilité relative vers l'anode par rapport au front de migration, leur R_f est de 0,80 pour la mCS, de 0,70 pour l'hCS, de 0,52 pour la bCS, de 0,51 pour la rCS, de 0,40 pour la rCM, de 0,16 pour l'oCS et de 0,14 pour la cCS. Par analogie, nous indiquons les R_f mesurés de quelques protéines de référence : 0,64 pour la sérumalbumine humaine, 0,58 pour l'hGH, 0,39 pour l'oPRL et 0,22 pour l'oGH et la bGH. Ces valeurs proviennent des données des différents groupes qui ont isolé les hormones lactogènes placentaires (Tableau IX). Elles correspondent au composé majeur de l'hormone. En effet, lorsque les tubes de gels de polyacrylamide (7,5%) sont suffisamment chargés en échantillons, trois à quatre isohormones sont observées. Les bandes qui migrent le plus rapidement vers l'anode correspondraient, d'après les études de SHERWOOD (1967) sur l'hCS, à des désamidations. De plus, l'hétérogénéité des molécules natives d'hCS a été postulée par TURLLE & coll.(1966). BELLEVILLE & coll.(1972) identifieront effectivement deux espèces de composés d'hCS purifiées par électrophorèse en gel de polyacrylamide, et par focalisation isoélectrique : les unes migrent rapidement vers l'anode, les autres plus lentement. Les deux formes sont convertissables entre elles, le composé rapide étant formé par réduction des ponts disulfure.

Tableau IX

Mobilité électrophorétique comparée des hormones lactogènes placentaires.

<u>Hormones lactogènes placentaires</u>	Mobilité électrophorétique (Rf)*			Références
	FRIESEN	MARTAL	FELLOWS	BECKA
FEMME (hCS)	0,72	0,68		SHOWE & FRIESEN (1974) MARTAL & DJIANE (1975)
SINGE (mCS)	0,80			SHOWE & FRIESEN (1974)
BREBIS (oCS)	0,14	0,18	0,59	MARTAL & DJIANE (1975) CHAN & coll. (1976) HURLEY & coll. (1977)
CHEVRE (cCS)				BECKA & coll. (1977)
VACHE (bCS)			0,52	BOLANDER & FELLOWS (1976a)
RATTE (rCh.)	0,40			ROBERTSON & FRIESEN (1975)
LAPINE (rCS)			0,51	BOLANDER & FELLOWS (1976c)
<u>Hormones hypophysaires</u>				
hGH	0,58			SHOWE & FRIESEN (1974)
oGH	0,25	0,20	0,27	MARTAL & DJIANE (1975) CHAN & coll. (1976) HURLEY & coll. (1977)
bGH		0,20	0,24	BOLANDER & FELLOWS (1976) MARTAL & DJIANE (1977)
oPRL		0,39		MARTAL & DJIANE (1975)
Sérumalbumine humaine (HSA)		0,64		MARTAL & DJIANE (1975)

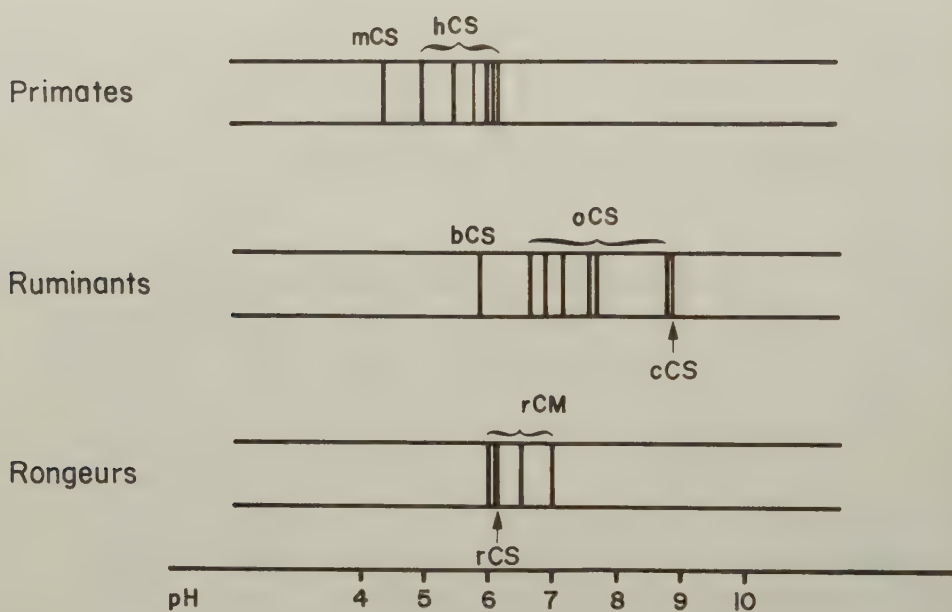
* à pH alcalin, en gel de polyacrylamide à 7,5%

Les deux formes paraissent exister dans les conditions physiologiques normales, car elles sont purifiées à partir de placentas normaux à terme, et sont synthétisables indépendamment in vitro (ELLISVILLE & coll. 1973), mais la forme rapide est davantage marquée par les aminoacides radioactifs, donc davantage synthétisée.

D'ailleurs, SUWA & FRIEDSEN (1969 a,b) avaient suggéré l'existence de deux pools tissulaires d'hOS. Ce dimorphisme de l'hOS fut abondamment confirmé par KUMAI & coll. (1975) et JOHNSON & coll. (1977).

L'estimation du point isoélectrique de l'oCS à 7,2 (MARTAL & DJIANE, 1975, P_{IX}) est grosso-modo en accord avec les déterminations (6,8 et 7,7) d'HURLEY & coll. (1977). En réalité, il faut admettre une certaine hétérogénéité des molécules d'oCS puisque CHAN & coll. ont trouvé un pI égal à 8,8 pour leur préparation d'oCS. Le comportement de l'oCS en chromatographie d'échangeurs d'anions (DEAE Séphadex) ou de cations (CM Séphadex) est en accord avec le pI 7,2 que nous avons déterminé. Les comportements électrophorétiques presque identiques de l'oCS d'une part (R_f : 0,18), et de l'oGH et de la bGH d'autre part (R_f : 0,20), sont en accord avec la valeur de leur pI. En effet, les pI de l'oGH et de la bGH sont estimés à environ 6,8 (FELLOWS & coll. 1976).

31) pI apparent des divers hormones lactogènes placentaires



Le Point isoélectrique apparent (pI) des diverses hormones lactogènes placentaires est résumé dans le Tableau X et la Fig. 31. Le pI des bandes majeures est de 4,4 pour la mCS. D'après des études récentes, CHATTERJEE & coll.(1977) ne sont pas parvenus à déterminer des bandes majeures pour l'hCS dont les profils de focalisation isoélectrique sont très variables d'un placenta à l'autre (pI : 5,0 ; 5,5 ; 5,6 ; 6,0 ; 6,1 ; 6,2). Le pI de la bCS est de 5,9, celui de la rCS de 6,1. La rCM présente trois bandes en focalisation isoélectrique qui se répartissent entre 6 et 7 sans bande majeure nette. Le pI de la cCS est de 8,8 d'après BECKA & coll. (1977).

Les hormones lactogènes placentaires présentent donc un polymorphisme comparable à celui observé dans les préparations de prolactine humaine (BEN DAVID & CHRAMBACH, 1974, HUMMEL & coll., 1975) et d'autres hormones (hGH, mGH, mPRL, HUMMEL & coll., 1975).

La cause de cette microhétérogénéité moléculaire n'est pas bien connue, mais elle ne correspond pas nécessairement à un artéfact de préparations, car on observe ce polymorphisme à partir d'extraits hypophysaires ou placentaires traités par des inhibiteurs de protéases ou par l'urée. L'isolement et une seconde focalisation isoélectrique des bandes n'altère pas leur pI (CHATTERJEE & coll., 1977). LORENSON & ELLIS (1975) notent une hétérogénéité des formes monomériques d'hormones de croissance ovine et bovine. Elle se traduit par des mobilités électrophorétiques et des pI

Tableau X

Points isoélectriques comparés des hormones lactogènes placentaires

Hormones	pI apparent*	Références
<u>Hormones lactogènes placentaires</u>		
mCS	4,4	VINIK & coll.(1973)
hCS	5,0 5,5 5,8 6,0 6,1 6,2	CEATTERJEE & coll.(1977)
bCS	5,9	BOLANDER & FELLOWS(1976)
rCS	6,1	BOLANDER & FELLOWS(1976)
rCN	3 bandes entre 6 et 7	ROBERTSON & FRIESEN(1975)
oCS	7,2 8,8	MARTAL & DJIANE(1975) CHAN & coll.(1976)
	6,8 ± 0,1 7,7 ± 0,1	HURLEY & coll.(1977)
cCS	8,8	BECKA & coll.(1977)
<u>Hormones hypophysaires</u>		
hPRL	5,2 5,7 6,2 5,4 5,8 5,9	BEN DAVID & coll.(1973) BEN DAVID & OHRAMBACH(1974) HUMMEL & coll.(1975)
hGH	4,6 4,8 5 5,4	HUMMEL & coll.(1975)
mGH	5,0 5,2 5,4 5,8	HUMMEL & coll.(1975)
mPRL	5,4 5,8 6,0	HUMMEL & coll.(1975)
bGH		FONSS-BECH & LI(1954)
oPRL		LI, LYONS & EVANS(1940) LI(1972)

* une seule valeur correspond à celle de la bande majeure

différents correspondant à des résidus N terminaux également différents. YADLEY & CHRAMBACH (1973) observent des isohormones d'hGH possédant des activités prolactiniques basses ou hautes selon les préparations standards d'hGH. La digestion d'hGH par la plasmine conduit également à une transformation progressive d'isohormones à mobilité électrophorétique lente en isohormones à mobilité électrophorétique rapide, ainsi qu'à une augmentation parallèle de l'activité lactogène sans qu'il y ait toutefois de désamidations. Enfin, SINGH & coll. (1974) obtiennent des formes d'hGH modifiée par la plasmine qui présentent des activités de croissance (6,9 U.I./mg) et des activités lactogènes (14,5 U.I./mg) supérieures à celles de l'hormone native intacte.

En conclusion, la connaissance du P.M., de la taille, de la mobilité électrophorétique et du point isoélectrique de l'oCS permet de mieux comprendre le comportement de cette hormone lors de son isolement, et de dégager des différences structurales importantes entre les diverses hormones lactogènes et somatotropes. L'étude des propriétés immunologiques de l'oCS devrait davantage affiner la caractérisation physico-chimique de cette molécule.

CHAPITRE IV

Propriétés immunologiques de l'oCS

Nous avons vu que les poids moléculaires des prolactines, des hormones de croissance et des hormones lactogènes placentaires étaient presque identiques. Le point isoélectrique de l'oCS est très proche de celui de l'hormone de croissance ovine. Ces propriétés physicochimiques rendent donc très difficile la séparation de ces deux hormones. L'oCS se lie à la fois aux récepteurs membranaires spécifiques de l'hormone de croissance et à ceux spécifiques de la prolactine. Mais les dosages radiorécepteurs seuls ne permettent pas de discerner l'activité somatotrope due à l'OGH et celle due à l'oCS, ou l'activité lactogène due à la prolactine et celle due à l'oCS.

Aussi examinerons-nous, dans ce chapitre, les propriétés immunologiques de ces diverses hormones afin de mieux caractériser les activités propres à chacune d'elles.

METHODES

1. Immunodiffusion en gel d'agarose, selon la méthode d'OUCHTERLONY.

Principe : Cette méthode est l'application, en gel d'agar, de la réaction d'immunoprécipitation. Au point de rencontre de la diffusion des antigènes et des anticorps dans la gélose, apparaît une ligne de précipitation, si les doses sont convenables et s'il existe une identité immunologique (partielle ou totale) entre les antigènes et les anticorps. Cette immunodiffusion peut être réalisée en présence d'immunsérum en quantité constante et d'antigène en quantités variables ou inversement. Pour que la réaction de précipitation se produise, il faut se situer dans la zone d'équivalence des concentrations d'antigènes et d'anticorps, la précipitation ne se produisant pas dans les zones d'excès d'antigènes ou d'excès d'anticorps.

Technique

1. Obtention du gel : Le gel est un mélange d'une solution (ââ) d'agarose à 1% dans du tampon Véronal 0,05 M, pH 8,6 et d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition, filtré sur gaze et conservé à 4°C.

2. Préparation des lames : Le gel est réchauffé au Bain-Marie. Des lames de microscope sont préalablement enduites de gel à raison de quelques gouttes par lame. Ces lames sont ensuite placées bien horizontales sur une plaque de verre. Environ 3 ml de gel sont alors déposés, au moyen d'une seringue continuellement réchauffée dans de l'eau, afin d'empêcher la prise en masse de la gélose. Des puits sont creusés avec un

emporte-pièce lorsque le gel est solidifié, au bout de 30 mn environ. Les lames sont ensuite placées dans des boîtes de Pétri saturées d'eau avec du papier buvard mouillé. Dans quelques cas, au lieu d'utiliser des lames de microscope, la gélose est directement coulée dans la boîte de Pétri.

3. Antigènes éprouvés : prolactine ovine PS7 N.I.H. (24 U.I./mg), hormones somatotropes ovines oGH N.I.H. (1 U.I./mg), bovine B12 N.I.H. ou bGH PENTEX (Laboratoires MILES) 1 U.I./mg, humaine hGH N.I.H. (lot HS 1 394 : 2 U.I./mg d'activité de croissance et 6 U.I./mg d'activité prolactinique), hormone lactogène placentaire humaine hPL (Nutritional Biochemical Corporation), gonadotrophine chorionique humaine hCG (Laboratoire Endopancrine) 1 500 U.I./mg. Enfin, divers lots de préparation d'oCS furent testés.

4. Immunsérums : Les immunsérums anti-oCS, anti-hCS et anti-hGH sont préparés en injectant par voie sous-cutanée à des Lapins de race Néo-Zélandaise, 1 mg d'oCS purifiée, d'hCS (N.B.C.) ou d'hGH (N.I.H.) dilué dans 0,5 ml de sérum physiologique (NaCl 9%), et mélangé, à volume égal, avec de l'adjuvant de Freund (alternativement complet ou incomplet). Ces injections sont réalisées 1 à 2 fois par mois pendant environ 4 mois, jusqu'à ce que le titre des sérums soit satisfaisant.

Les immunsérums anti-bGH, anti oGH et anti-prolactine ovine sont préparés en injectant à des cobayes 0,25 mg d'hormone par voies sous-cutanée et intrapéritonéale dans de l'adjuvant de Freund (complet ou incomplet) pendant plusieurs mois.

5. L'immunodiffusion : Les antigènes et les anticorps diffusent à 4°C pendant 48 à 72 heures. Les résultats sont lus sur fond sombre ou après coloration.

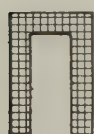
6. Coloration : Les lames sont lavées pendant 24 h dans un plateau contenant une solution de NaCl 9‰ afin d'éliminer les protéines qui n'ont pas participé à la réaction antigène-anticorps. Les lames sont ensuite séchées avec un papier filtre. Les protéines sont colorées à l'Amidoschwartz avec la solution suivante :

- Amidoschwartz 1 g
- tampon acétate de sodium (60 ml d'acide acétique, 13,5 g d'acétate de sodium dilué dans de l'eau, eau distillée q.s.p. 1 l).
- glycérol 150 ml.

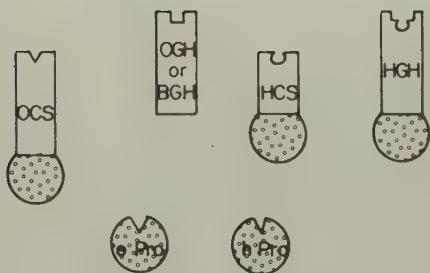
Après filtration, la solution est conservée à la température du laboratoire. La coloration dure 10 mn. Les lames sont décolorées par des bains répétés d'acide acétique à 2% (850 ml) et de glycérol (150 ml).

32

RECEPTOR SITES

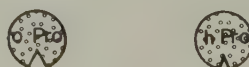
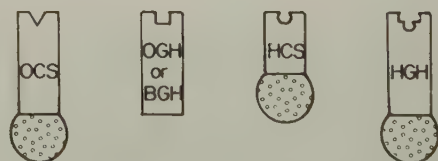
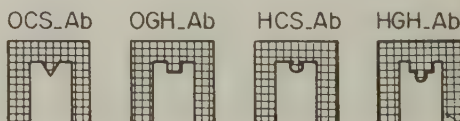


Growth hormone receptor



Lactogen receptor

ANTIBODY SITES



e-Pro-Ab



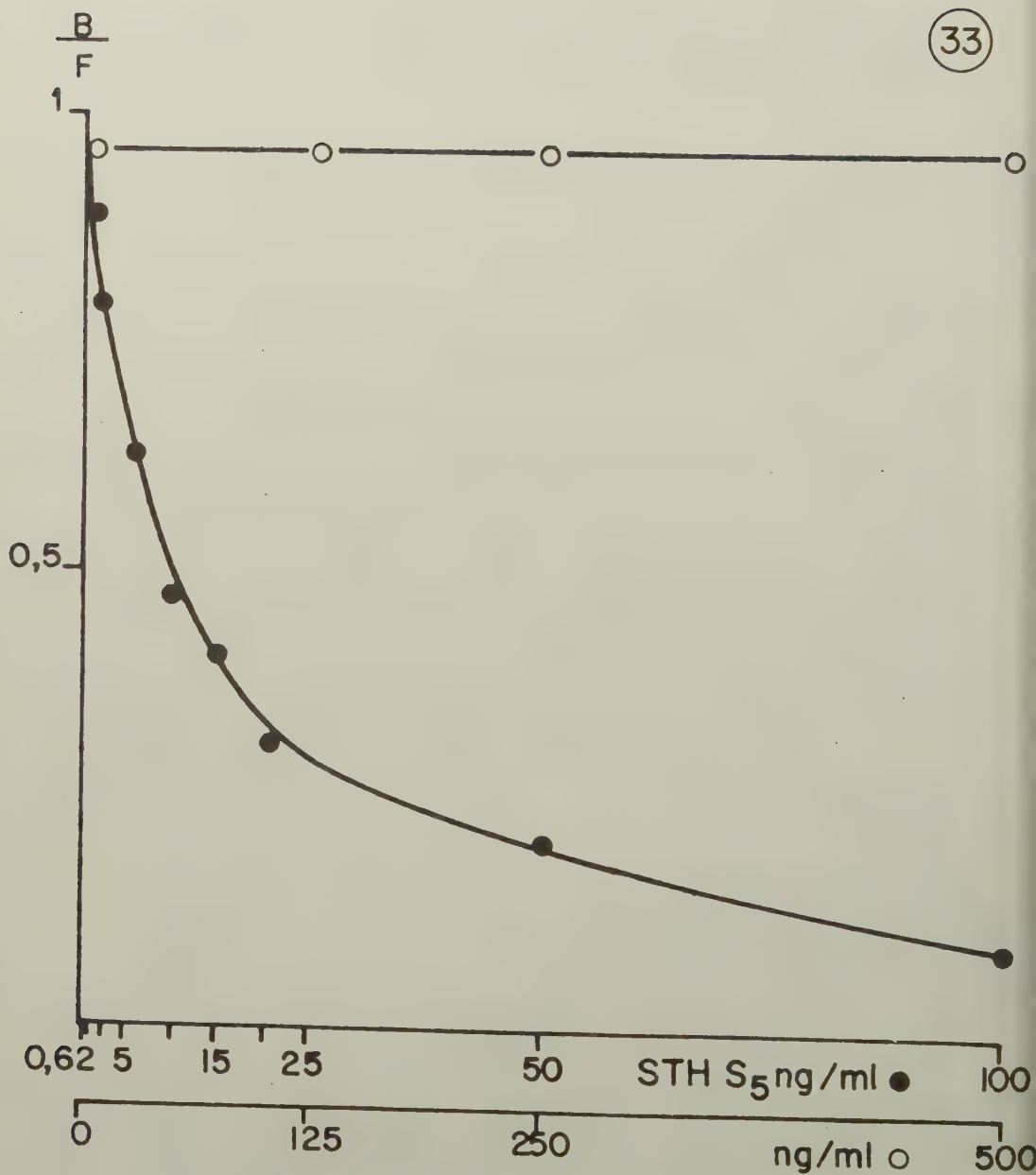
h-Pro-Ab

2. Dosage radioimmunologique de l'hormone de croissance ovine. Il est réalisé selon la méthode à double anticorps de MARTAL (1973, P₅)

Principe : C'est une méthode de compétition entre une hormone radioactive en quantité constante et une hormone non radioactive en quantité variable vis-à-vis d'anticorps dilués en quantité également constante. A la différence du dosage radiorécepteur, le dosage radioimmunologique utilise la spécificité d'espèces des anticorps (Fig. 32). Pour visualiser les complexes antigènes-anticorps, une seconde réaction immunologique est pratiquée : des anticorps anti- γ globulines, peu dilués, précipitent, à l'aide d'un sérum entraîneur, les anticorps des complexes antigènes-anticorps. Après centrifugation, les surnageants sont éliminés et les culots radioactifs sont comptés.

Technique

1. Immunsérums anti-oGH : Pour obtenir des anticorps présentant une affinité élevée vis à vis de leur antigène, condition nécessaire à un dosage radioimmunologique sensible, il est nécessaire d'immuniser suffisamment longtemps les animaux avec l'oGH ou la bGH, en raison du faible pouvoir immunogène de ces protéines. Les cobayes reçoivent pendant 7 à 8 mois, par voies sous-cutanée et intrapéritonéale, 0,25 à 1mg d'oGH N.I.H. ou de bGH Pentex émulsionnée à volume égal dans de l'adjuvant de FREUND (complet puis incomplet). Le sang est régulièrement prélevé dans le sinus rétro-orbitaire à l'aide d'une pipette Pasteur, et le titre des sérums est apprécié avec de l'hormone marquée à l'iode radioactif (MARTAL, 1972, P₃) (Chapitre I). Les immunsérums de cobaye anti-oGH sont employés en dosage radioimmunologique à la dilution finale de 10^{-5} ,



Spécificité du dosage radioimmunologique
de l'hormone de croissance ovine (●)
vis-à-vis des autres hormones antehypophysaires (○)
(Prolactine PS₉ NIH, FSH S₁ NIH, TSH S₂ NIH,
LH S₈ NIH, LH M₃, ACTH M₆₅ BYLA) et de l'OCS (○)

dans du tampon Véronal 0,0125 M pH 8,6 additionné de sérumalbumine humaine 2,5%, de merthiolate 0,1%, de sérum de cobaye entraîneur à la dilution finale de 10^{-3} et de 0,003M d'EDTA(Ethylène Diamine Tétracétate).

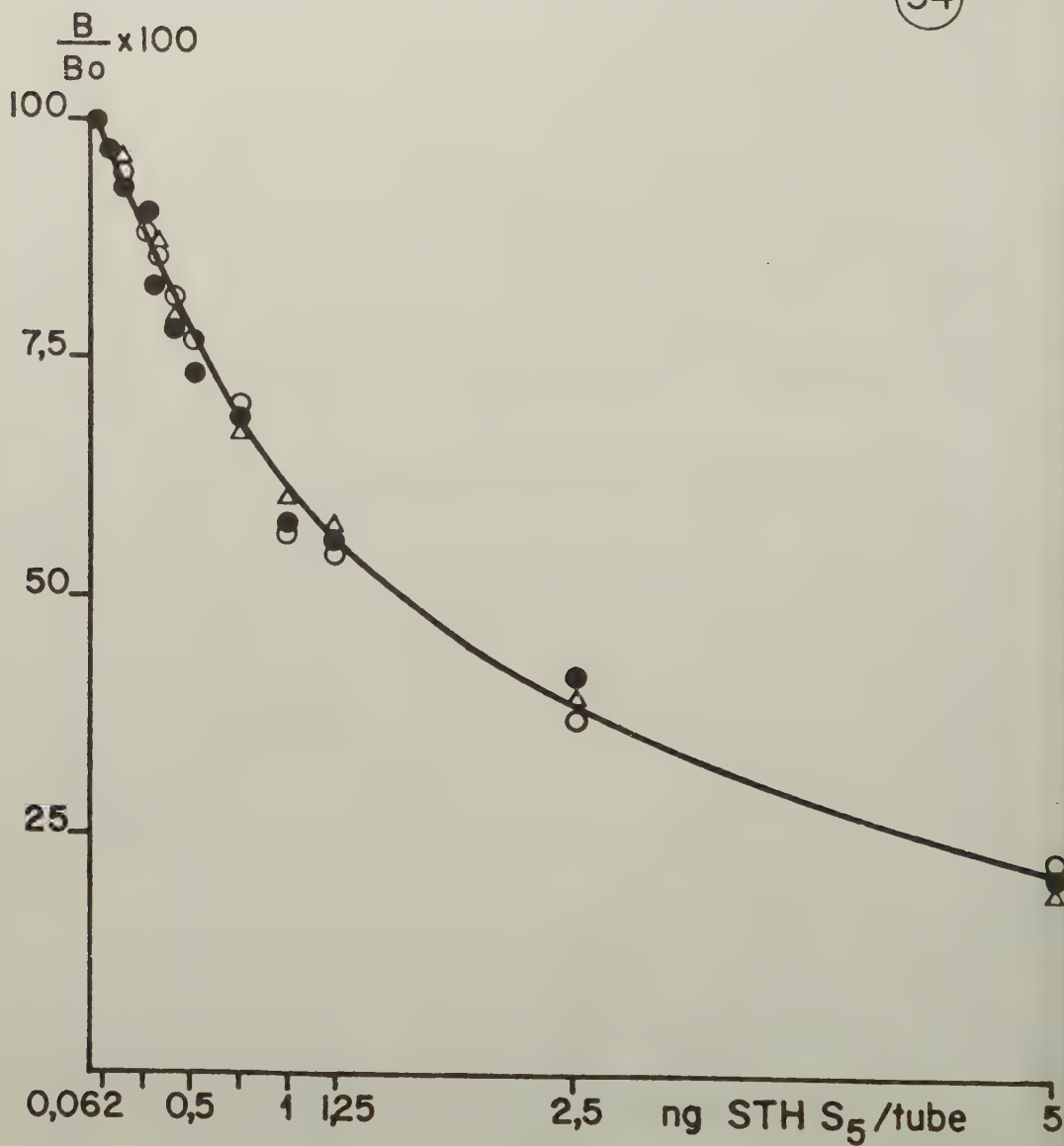
2. Immunsérum de Lapin anti- γ globuline de cobaye

Des Lapins de race Néo-Zélandaise sont hyperimmunisés pendant deux mois par voies sous-cutanée et intraveineuse. Ils reçoivent une quantité totale de 25 mg de γ globuline de cobaye (purifiée par précipitation sélective au sulfate d'ammonium à 33% de saturation).

3. Conditions d'incubation. Le tampon d'incubation est du tampon Véronal 0,0125 M, pH 8,6, sérumalbumine humaine 2,5%, merthiolate 0,1%. Les courbes standard sont établies en ajoutant des quantités variables de GH étalon (de 30 pg à 5 ng) à un milieu contenant : l'immunsérum anti-GH (dilution finale 10^{-5}) et un volume (par tube) de 50 μ l de plasma de Brebis hypophysectomisée lors des dosages d'échantillons plasmatiques. La durée d'incubation est de 5 jours à 4°C. Le complexe hormone radioactive-anticorps-antiGH est précipité avec 50 μ l d'immunsérum anti γ globuline non dilué (1 h à 20°C). Cette seconde incubation est arrêtée avec 2 ml par tube de tampon froid sans albumine et par une centrifugation (2 500 g pendant 30 mn). Le surnageant est aspiré et la radioactivité du précipité est mesurée.

4. Caractéristiques de la technique de dosage :

La Fig. 33 montre que la présence de quantités importantes de diverses hormones hypophysaires (Prolactine P S₉ N.I.H., FSH S₁ N.I.H., TSH S₂ N.I.H., LH S₈ N.I.H., LH M₃ de JUTISZ, ACTH M₆₅ BYLA) ne modifie pas l'affinité de la GH radioactive pour les anticorps anti-GH.



Spécificité du dosage radioimmunologique de l'hormone
de croissance ovine vis-à-vis des facteurs plasmatiques
o Tampon Véronal 0,0125M, pH 8,6,
Sérumalbumine humaine 2,5 ‰
Sérum de brebis hypophysectomisée (20 μl ●, 100 μl Δ)

La Fig. 34 démontre qu'aucun facteur plasmatique aspécifique ne perturbe les réactions immunologiques. La spécificité du dosage est encore prouvée par dilutions successives d'un plasma d'Agneau nouveau-né riche en oGH ou d'un extrait acétonique de poudre hypophysaire ovine. Le seuil de sensibilité du dosage est en moyenne de 0,6 ng de STH par ml de plasma. Le coefficient de variation de la méthode est de 2-5% dans un même dosage, et de 10-15% d'un dosage à l'autre.

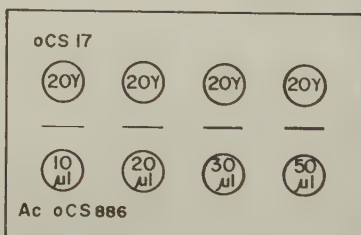
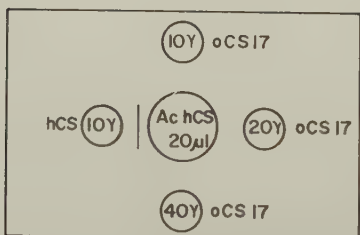
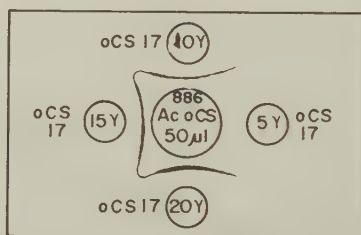
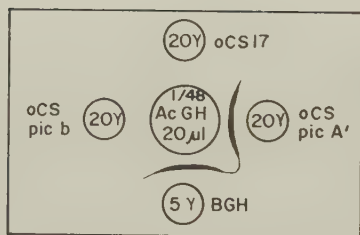
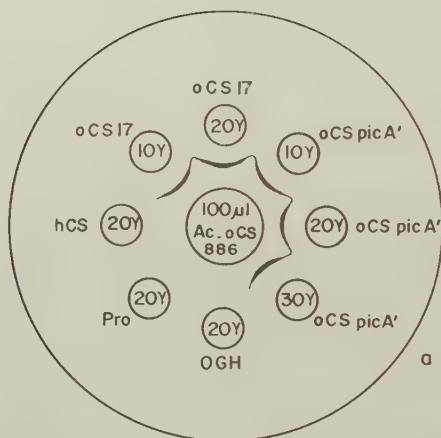
3. Dosage radioimmunologique de la prolactine ovine.

Il est réalisé par G.KANN (1971) selon une méthode identique à celle du dosage radioimmunologique de l'hormone de croissance décrite ci-dessus.

4. Immunofluorescence.

Cette méthode est réalisée par M.P.DUBOIS et est décrite dans le Chapitre de la localisation placentaire de la synthèse de l'oCS (MARTAL & coll., 1977, P_{16x})

35



RESULTATS

Par immunodiffusion (MARTAL & DJIANE, 1975, P_{8x}, MARTAL, 1978, P_{18x}), un seul arc de précipitation est observé entre l'immunsérum anti-oCS non dilué (100 μ l) et différentes concentrations (10-30 μ g) de plusieurs préparations d'oCS (Fig. 35a). En revanche, aucune identité immunologique n'est observée avec l'hormone lactogène placentaire humaine, la prolactine ovine et l'hormone de croissance ovine (Fig. 35a), quelles que soient les concentrations d'antigènes étudiées (20-200 μ g). Il en est de même avec la bGH, l'hGH et l'hCG. Inversement, un immunsérum anti-oGH ne montre pas de réaction croisée entre l'oCS purifiée (lots b et 17) et la bGH (Fig. 35b). Par contre, une préparation d'oCS très faiblement purifiée (pic A') présente (Fig. 35b) un arc de précipitation d'identité totale avec la bGH, ce qui suggère une forte contamination par l'hormone de croissance hypophysaire d'origine, très probablement, foetale puisque les concentrations sanguines d'hormone de croissance sont élevées chez le foetus (Fig. 15) et non chez la mère (BASSETT & coll., 1970, MARTAL, 1973, P₅).

Un immunsérum anti-hCS présente un arc de précipitation avec l'hCS, mais aucune immunoprécipitation avec l'oCS, quelles que soient les doses utilisées (10 à 200 μ g, Fig. 35c). Des arcs de précipitation sont obtenus entre l'oCS et un sérum anti-oCS en présence d'une quantité constante d'anticorps et d'une concentration croissante d'oCS (Fig. 35d). Pour la concentration de 5 μ g, l'immunsérum est en excès d'anticorps

Tableau XI

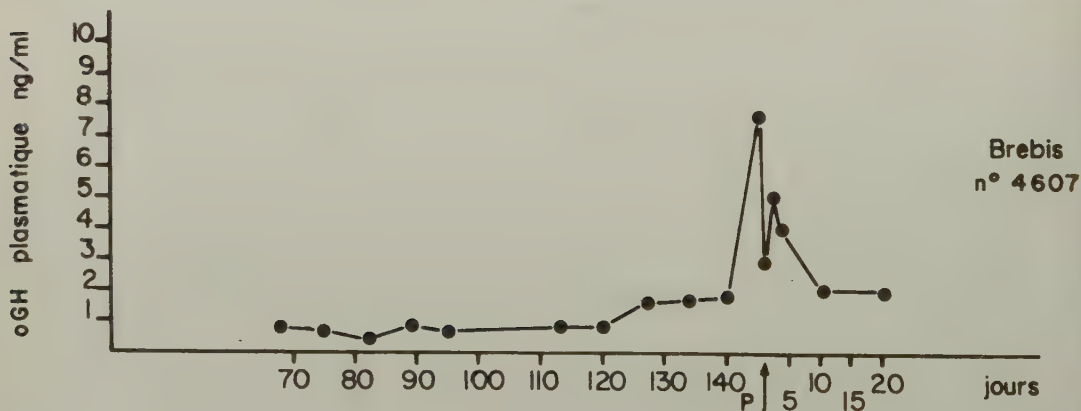
Réaction immunologique croisée
entre différentes hormones

	oCS	hCS	oPRL	oGH	bGH	hGH
IS* anti-oCS	+	-	-	-	-	-
IS anti-hCS	-	+	-	-	-	+
IS anti-oPRL	-	-	+	-	-	-
IS anti-oGH	-	-	-	+	+	-
IS anti-bGH	-	-	-	+	+	-
IS anti-hGH	-	+	-	-	-	+

*IS : Immunsérum

36

Variation plasmatique de l'oGH au cours de la gestation



anti-oCS, ce qui explique l'absence de ligne de précipitation. Inversement, en présence d'une quantité constante d'antigène oCS et d'une concentration croissante d'anticorps anti-oCS, on observe également des immuno-précipitations (Fig. 35e).

Par dosages radioimmunologiques, aucune réaction croisée n'est observée entre l'hormone de croissance (Fig. 33) ou la prolactine ovines et les préparations d'oCS purifiée. Ces résultats sont confirmés lors du dosage radioimmunologique de l'hormone somatotrope chez la Brebis gestante (Fig. 36). En effet, les niveaux sériques d'oGH restent très bas jusqu'à la parturition, alors que le taux sanguin d'oCS augmente considérablement (MARTAL & DJIANE, 1977, P_{14x}).

L'ensemble des résultats obtenus par immunodiffusion et radioimmunologie est résumé dans le tableau XI : Les anticorps anti-oCS précipitent l'oCS mais non l'hCS, l'hGH, la prolactine ovine, la bGH et l'oGH.

Les anticorps anti-hCS précipitent l'hCS et partiellement l'hGH. Réciproquement, les anticorps anti-hGH précipitent l'hGH et partiellement l'hCS.

Les immunsérums anti-oGH ou anti-bGH réagissent indifféremment en immunoprécipitation comme en radioimmunologie avec l'oGH ou la bGH.

Enfin, les immunsérums anti-prolactine ovine ne précipitent pas l'hCS, l'oGH, la bGH, l'hGH, ni l'oCS.

Les résultats d'immunofluorescence confirment (DUBOIS & coll., 1976, O₁₂, MARTAL & coll., 1977, P_{16x}) les résultats précédents. Lorsque des coupes de placentomes ovins sont traitées par une technique indirecte avec des anticorps anti-oCS, une réaction d'immunofluorescence est observée. Cette réaction immunologique est inhibée par l'antigène spécifique, l'oCS, mais non par la prolactine ovine, la bGH, l'oGH, l'hCS, ni tout autre hormone peptidique comme l'hCG, la PMSG, l'ACTH, la LH ou la somatostatine. Réciproquement, les anticorps dirigés contre ces hormones ne présentent pas de réaction d'immunofluorescence en présence de coupes de cotylédons ovins.

Enfin, lorsque des coupes de cotylédons bovins provenant de placentas de fin de gestation, sont traitées avec un immunsérum anti-oCS, aucune réaction d'immunofluorescence n'est observée, ce qui suggère une absence de réaction immunologique croisée entre l'oCS et la bCS. Il en est d'ailleurs de même entre des coupes de placentas humains prélevés au moment du terme et des anticorps anti-oCS.

DISCUSSION

L'emploi de diverses techniques : immunodiffusion, radioimmunologie, immunofluorescence et l'étude des variations sériques d'oGH au cours de la gestation, permettent de confirmer (MARTAL, 1978, P_{18x}) nos résultats préliminaires (MARTAL & DJIANE, 1975, P_{8x}, MARTAL, 1973, P₅, MARTAL & coll., 1977, P_{16x}).

A la différence de FELLOWS & coll. (1976) et comme BLANK & coll. (1977) et WALLACE & coll. (1973), nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence une identité immunologique, même partielle, entre l'oCS et l'oGH. Il est toutefois utile de noter que FELLOWS & coll. (1976) n'observent qu'une faible réaction immunologique croisée entre l'oCS et l'oGH, en présence d'immunsérums anti-oCS et non avec des sérums anti-oGH, et cette immunoprécipitation n'apparaît qu'au bout de 36 à 48 h. En raison de l'homologie structurale très probablement étroite entre ces deux molécules d'hormones, comme nous le discuterons au chapitre suivant, on ne peut exclure que certains traitements, au cours de la purification, aient pu démasquer un déterminant antigénique normalement caché dans la molécule intacte. D'après ses propriétés immunologiques, la molécule d'oCS semble structuralement plus éloignée de la molécule d'oGH que l'hCS de l'hGH. La structure de la molécule d'oCS paraît assez différente de celle de l'hCS, son homologue placentaire, puisqu'il n'existe pas de réaction croisée entre l'oCS et l'oGH, et l'activité de croissance des préparations d'oCS est considérablement plus

élevée (environ 1 U.I./mg) que celle de l'hCS qui est minime (JOSIMOVICH & coll., 1968, TSUSHIMA & FRIESEN, 1973, KELLY & coll., 1976). En raison de l'absence d'activité de croissance de la molécule de prolactine ovine et des différences immunologiques constatées, les molécules d'oCS et de prolactine ovine semblent également assez éloignées.

L'absence de réaction immunologique entre l'oCS et la bCS, observée par immunofluorescence, est en accord avec les résultats d'immunoprécipitation de FELLOWS & coll. (1976) et de radioimmunologie de BOLANDER & FELLOWS (1977).

Enfin, la connaissance des propriétés immunologiques de l'oCS permet de résoudre un certain nombre de problèmes. Puisqu'il n'existe pas de réaction immunologique croisée entre l'oCS et la prolactine ou l'hormone de croissance ovines, il est possible d'apprécier, par dosage radioimmunologique, la contamination des préparations d'oCS par ces hormones (Chapitre I). Il est également possible de distinguer, à la suite d'un dosage radiorécepteur, l'activité lactogène ou l'activité somatotrope propre à l'oCS en déterminant, par radioimmunologie, les concentrations d'oPRL ou d'OGH du sérum ou des extraits placentaires à analyser (MARTAL, 1977, P_{17x}). L'application de ces principes sera abondamment utilisée lors de l'étude de la production d'oCS chez la Mère et chez le Foetus.

CHAPITRE V

Structure des hormones lactogènes placentaires

INTRODUCTION

Le caractère bifonctionnel de l'hormone lactogène placentaire ovine nous incite à connaître sa séquence primaire et la localisation de ses sites actifs. Les propriétés immunologiques de cette hormone nous interrogent sur la structure de ses déterminants antigéniques. Le caractère bicéphale de l'oCS nous interpelle sur la place phylogénique qu'il convient de laisser au groupe des hormones lactogènes placentaires notamment par rapport à la famille des prolactines et à celle des hormones de croissance et sur l'hypothèse d'une origine commune à ces trois familles.

Il est évidemment trop tôt pour répondre de manière pleinement satisfaisante à toutes ces questions. La structure primaire de l'oCS est encore inconnue et le nombre des séquences connues des prolactines, des hormones de croissance et des hormones lactogènes placentaires est encore très limité. Néanmoins, il est possible d'établir une telle quantité d'homologies entre ces diverses molécules qu'il serait regrettable de ne pas chercher, dès maintenant, à mieux connaître la famille des hormones

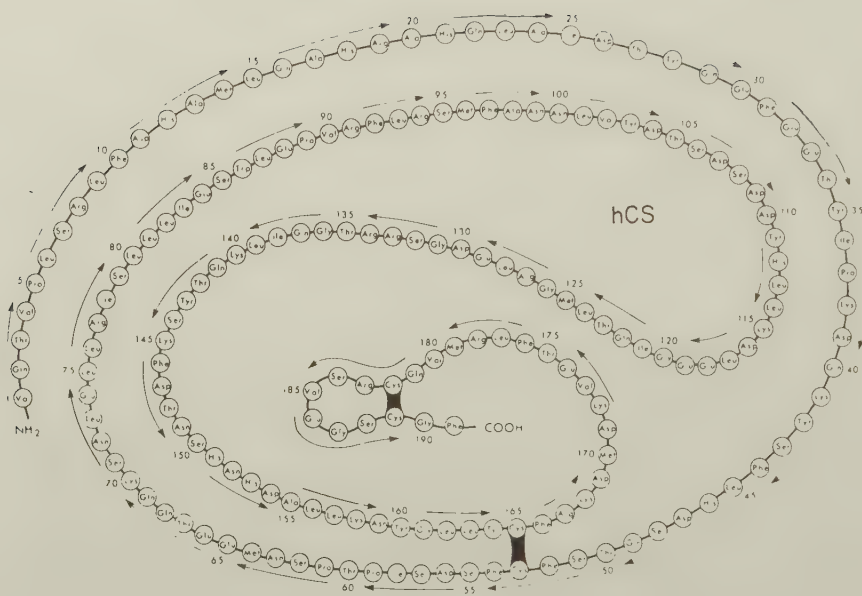


Fig.

37

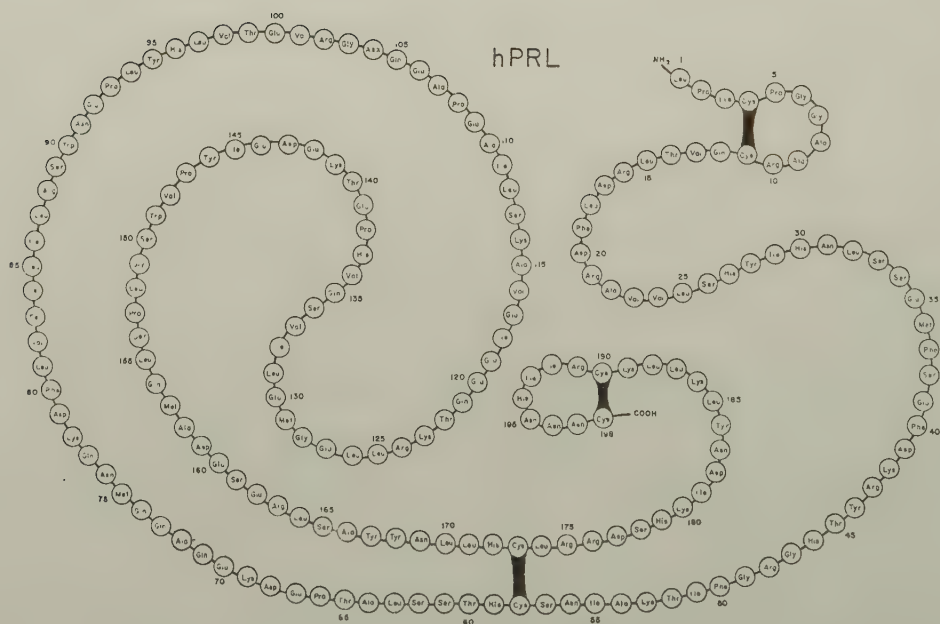


Fig.

38

lactogènes placentaires, tant au point de vue de sa conformation et de son évolution qu'au point de vue de la structure de ses sites fonctionnels. Des études plus poussées sur l'hCS devraient profiter de l'analyse approfondie entreprise dans ce chapitre sur la conformation de ces molécules.

1. Comparaison directe des structures primaires des molécules d'hCS, de prolactines et d'hormones de croissance. L'hCS est la seule hormone lactogène du placenta dont on connaisse la structure primaire complète ; c'est le résultat du travail de trois équipes : VART & coll., 1967, NIALL 1971, LI & coll. 1971, 1973, et SHERWOOD & coll. 1971).

La séquence de l'hCS est schématisée Fig.37. Lorsqu'on la compare à la prolactine humaine (hPRL) Fig.38, on voit que la molécule d'hCS possède une chaîne polypeptidique plus courte, 191 aminoacides au lieu de 198, et deux ponts disulfure au lieu de trois. Ces deux hormones lactogènes ne présentent que 12 aminoacides situés rigoureusement à la même position (selon les Fig. 37 et 38).

Curieusement, c'est avec la molécule d'hGH, l'hormone de croissance humaine (Fig.39) que la molécule d'hCS présente de très nombreuses analogies structurales. La chaîne polypeptidique de ces deux molécules est de la même longueur. Leurs extrémités-COOH sont identiques. Elles possèdent toutes les deux le même nombre de ponts S-S. La comparaison de leur séquence fait apparaître 162 aminoacides en positions rigoureusement identiques. C'est la moitié COOH de la chaîne polypeptidique de ces deux hormones qui est la plus semblable, car il existe seulement quatre aminoacides différents entre le 113ème et le 191ème.

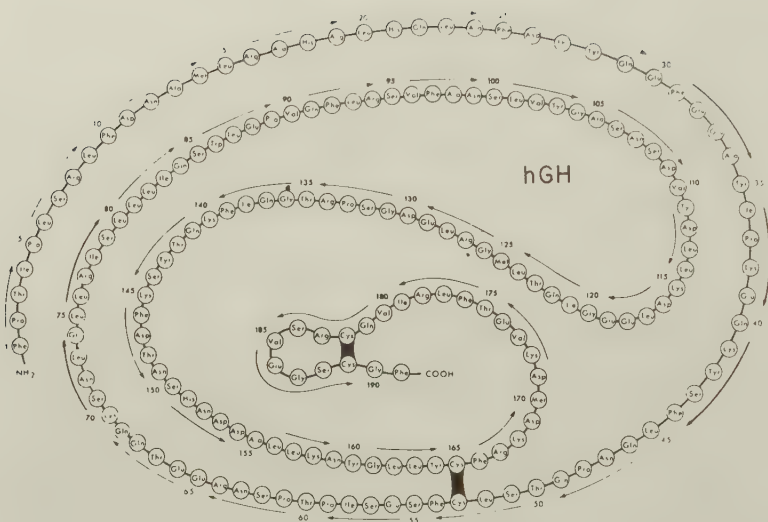


Fig. (39)

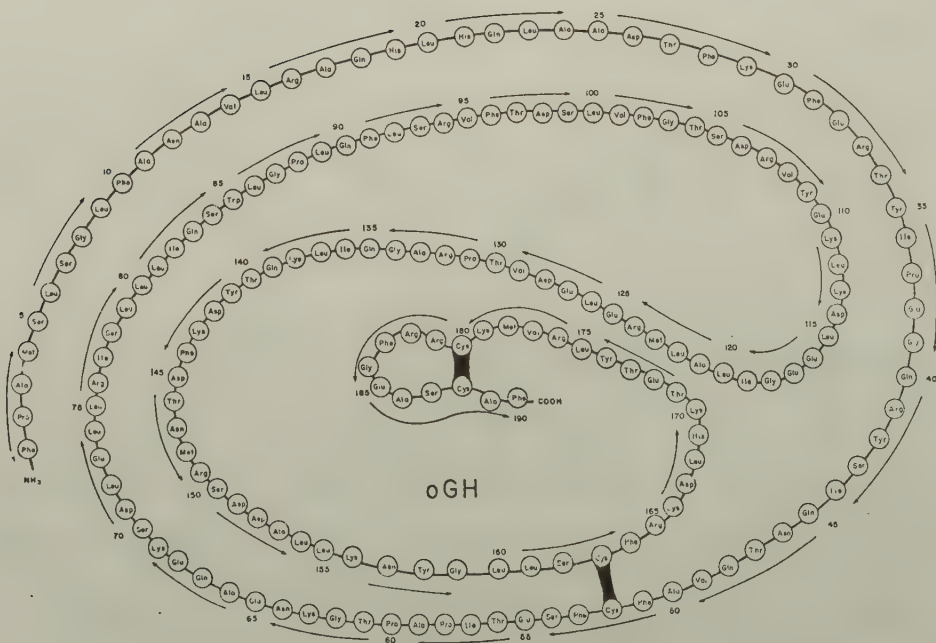


Fig (40)

La structure primaire de l'hormone lactogène placentaire humaine apparaît donc beaucoup plus proche de celle de l'hormone de croissance humaine que de celle de la prolactine humaine. Cette ressemblance structurale est d'autant plus surprenante que l'activité de croissance de l'hormone lactogène placentaire humaine est faible (Tableau I). L'hormone de croissance humaine possède toutefois une activité lactogène élevée (CHRAMBACH & coll., 1973, SHIU & coll., 1973).

Comparée à la structure de l'hormone de croissance ovine (Fig.40), la séquence d'hCS présente 29 aminoacides en positions identiques. Comparée à la structure de la molécule de prolactine ovine (Fig.41); la molécule d'hCS ne présente que 14 aminoacides en positions rigoureusement identiques. En revanche, les molécules de prolactine d'espèces différentes (humaine et ovine)(Fig.38 et 41) possèdent 66 aminoacides en positions rigoureusement identiques. Les molécules d'hormones de croissance humaine (Fig.39) et ovine (Fig.40) ne contiennent que 34 aminoacides en positions rigoureusement identiques. Nous verrons plus loin que l'analyse détaillée des homologies externes (Fig.42) de ces différentes molécules ne fait que confirmer ces observations d'analogies structurales en amplifiant toutefois les identités moléculaires à l'intérieur des familles de prolactines et d'hormones de croissance.

Il résulte de ces analyses globales de structure primaire que la molécule d'hormone lactogène placentaire humaine est nettement plus proche du groupe des hormones de croissance que de celui des prolactines. L'activité de croissance élevée des hormones lactogènes placentaires de Ruminants ne devrait que confirmer cette tendance apparemment étonnante. Les hormones lactogènes placentaires paraissent donc de structure hybride.

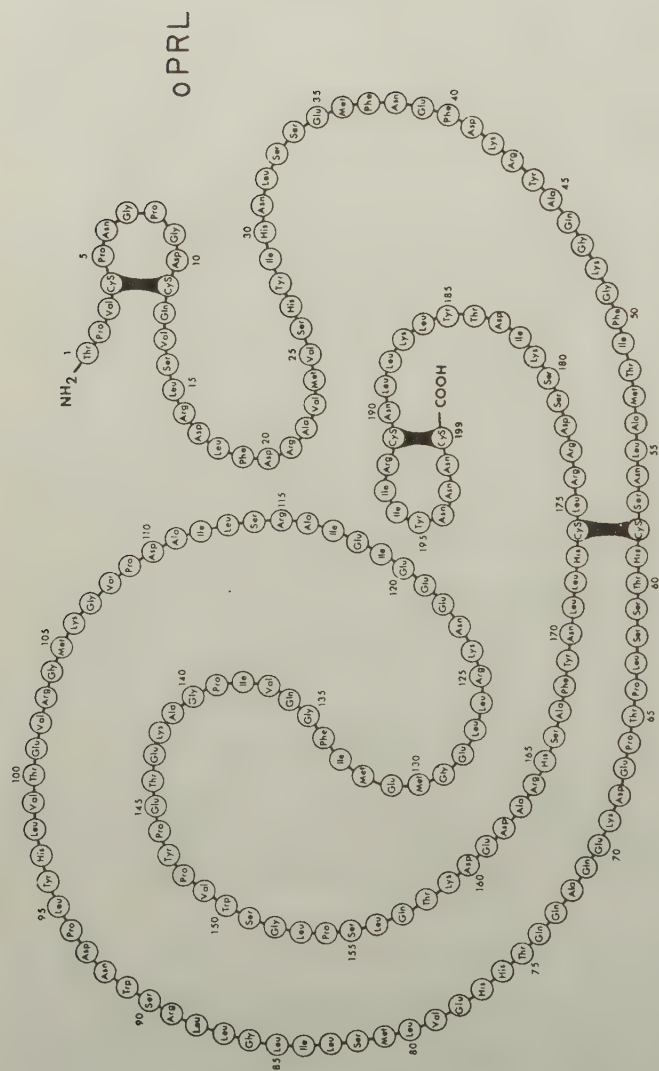


Fig. 41

2. Comparaison des homologies externes des structures primaires des molécules d'hCS, de prolactines et d'hormones de croissance. En raison des multiples modifications successives de structures primaires proposées par les divers auteurs, nous avons utilisé les séquences les plus récentes à notre disposition. Celles de LI (1978) pour la Somatomammotrophine Chorionique humaine (hCS) et l'hormone de croissance humaine (hGH), celle de SHOME & PARLOW (1977) pour la prolactine humaine (hPRL), celle de BIRK & LI (1978) pour la prolactine ovine (oPRL), de LI (1976) pour la prolactine porcine (pPRL) et de WALLIS (1974) pour la prolactine bovine (bPRL). Les séquences des hormones de croissance bovine (bGH), ovine (oGH) et équine (eGH) proviennent de celles de WALLIS (1973), GRAF & LI (1974) et de DAURAT-LARROQUE & coll. (1977). Nous nous sommes basés, pour établir les alignements (Fig.42), sur ceux proposés par LI (1972) et par DAYHOFF (1976). Bien qu'en position non rigoureusement identique d'après les Fig.37 à 41, les aminoacides analogues, après alignement des séquences, sont dits identiques. Les aminoacides qui correspondent à des mutations très fréquentes ou fréquentes (fréquence statistique observée sur plusieurs centaines de séquences de protéines, DAYHOFF, 1972, Fig.43) sont considérés comme homologues. Enfin les positions des résidus sont comptées à partir de l'extrémité NH_2 .

a) Comparaison des homologies de l'hCS et de l'hGH. Les analogies structurales entre l'hCS et l'hGH sont caractérisées, après alignement (Fig.42), par 162 résidus en positions identiques soit 85% d'identité entre ces deux molécules. Parmi les résidus non identiques, 22 aminoacides peuvent être classés comme homologues dont 18 correspondent à des mutations très fréquentes (*) et 4 à des mutations fréquentes (+). Les séquences d'hCS et d'hGH présentent alors une homologie totale de 96%. Parmi les 7 aminoacides non homologues, il est intéressant de remarquer que quatre aminoacides (en positions

17.

[illegible]

Fréquence de mutations ponctuelles des aminoacides
d'après la Sélection Naturelle (DAYHOFF 1972)

	Taux de mutation accepté						
	*	+	.	*	+	.	* > 40 très fréquent + 21-39 fréquent . 7-20 rare
Proline(Pro)	*						
Alanine(Ala)	.	*					
Glycine(Gly)	+	+	+				
Asparagine(asn)	+	+	.	*			
Glutamine(Gln)		+	.	*	*		
Acide Aspartique(Asp)	+	*	+	.	*	*	
Acide Glutamique(Glu)	.	*	.	*	+	+	
Thréonine(Thr)	+	*	.	*	+	*	
Sérine(Ser)		*	*	*	+	*	
Cystéine(Cys)	.	+	.	.	.	.	
Valine(Val)	.	.	.	.	+	.	
Isoleucine(Ile)		.	.	.	+	.	
Méthionine(Met)		.	.	.	+	*	
Leucine(Leu)		.	.	.	.	+	
Lysine(Lys)	.	.	.	*	+	.	
Arginine(Arg)		.	.	*	*	*	
Histidine(His)		*	*	*	.	.	
Phénylalanine(Phe)		*	*	*	.	+	
Tyrosine(Tyr)				*	*	*	
Tryptophane(Trp)						+	*

104, 110, 112 et 133, d'après les Fig. 37 et 39) sont dans la région du site actif de croissance, localisés au peptide 95-133, d'après les travaux du groupe SONENBERG, comme nous le verrons plus loin.

Le peptide 1-124, qui paraît être le siège des principales activités métaboliques, comprend 5 sur 7 des aminoacides à mutations exceptionnelles, en positions 1, 20, 104, 110 et 112 (d'après les Fig. 37 et 39). Le 7ème aminoacide non homologue (en position 153, Fig. 37 et 39) est compris dans un déterminant antigénique propre à la molécule d'hGH d'après LI, 1978. L'autre aminoacide (en position 179, Fig. 37 et 39) qui diffère de son homologue présent dans le peptide 140-191 de l'hCS, correspond à une mutation fréquente.

b) Comparaison des homologues de l'hCS et de l'hPRL. Lorsque l'on aligne les séquences de l'hCS et de l'hPRL, selon les méthodes de DAYHOFF en tenant compte des délétions possibles ("Gaps"), on observe 48 aminoacides identiques soit 24% d'identité entre l'hCS et l'hPRL, alors qu'il existe respectivement 72% et 78% d'identité entre l'hPRL et les prolactines ovine et porcine. (Tableau XII).

On peut souligner que 33 aminoacides sur les 48 sont des aminoacides invariants dans toutes les molécules examinées de prolactine (ovine et humaine), d'hCS et d'hormones de croissance (humaine, bovine, ovine). Les autres aminoacides identiques sont également communs à plusieurs molécules et se répartissent de la manière suivante : 11 sont des aminoacides communs aux molécules de prolactines (oPRL et hPRL), à l'hCS et à l'hGH, 2 sont communs à une molécule de prolactine (hPRL), à l'hCS et aux hormones de croissance (hGH, oGH, bGH). Les deux derniers aminoacides sont communs aux molécules d'hormones humaines (hCS, hPRL et hGH).

Tableau XII

Identité entre les structures primaires alignées
de différentes molécules d'hormones

Nombre d'acides aminés identiques

	hCS	hGH	oGH	bGH	eGH	hPRL	oPRL	pPRL
hCS		162	112	114	115	48	55	52
hGH	85%		122	124	122	51	56	42
oGH	59%	74%		189	173	49	52	51
bGH	60%	75%	99%		175	49	53	52
eGH	60%	74%	91%	92%		46	51	49
hPRL	24%	26%	25%	25%	23%		143	156
oPRL	27%	28%	26%	27%	26%	72%		163
pPRL	26%	21%	26%	26%	25%	78%	82%	

% d'identité

En définitive, les aminoacides identiques entre l'hCS et la prolactine humaine correspondent davantage à des aminoacides invariants qu'à des aminoacides caractéristiques de l'activité lactogène (37 sur 48, soit 77%). Ces observations suggèrent l'hypothèse de l'existence d'une molécule ancestrale commune à ces trois familles moléculaires. Nous verrons tout au long de ce chapitre s'accumuler les probabilités d'évolution par divergence de ces molécules.

La comparaison des séquences des molécules précédentes a attiré notre attention sur plusieurs mutations probables par délétion. Les résidus Proline en position 5 et Leucine en position 6 de l'hCS, de l'hormone de croissance humaine et des prolactines (Leu en position 15) paraissent identiques (LI, 1972). Cette constatation suppose une délétion correspondant à celle d'un petit peptide de 9 aminoacides (Fig.42). Le faible taux relatif de mutation de la Proline (Tableau XIII) d'après DAYHCOFF (1972) et la fréquence des résidus Leucine, parmi les aminoacides invariants dans les familles de prolactines et d'hormones de croissance, sont en accord avec cette hypothèse. De même, le résidu Proline en position 2 des hormones de croissance peut être aligné avec celui des molécules de prolactine (Fig.42). Seule l'hCS présente un résidu Glutamine en position 2 mais la fréquence de mutation entre ces deux aminoacides est élevée (Fig. 43). Dans les séquences des molécules de prolactine (Fig.42), plusieurs délétions d'acides (en positions 45, 46, 47, 61, 151 et 152) sont envisageables pour permettre un bon alignement de la séquence des autres molécules (hCS et hormones de croissance). Une délétion supplémentaire (en position 92) est également probable dans la séquence de la prolactine humaine. De même, d'après l'étude de l'alignement de leur séquence avec celles des prolactines, les molécules d'hCS et d'hormones de croissance présentent les

Tableau XIII

Fréquence relative de mutation des acides aminés
(d'après DAYHOFF, 1972)

Alanine	Ala	0,096	Asparagine	Asn	0,042
Glycine	Gly	0,090	Proline	Pro	0,041
Lysine	Lys	0,085	Isoleucine	Ile	0,035
Leucine	Leu	0,084	Histidine	His	0,034
Valine	Val	0,078	Arginine	Arg	0,034
Thréonine	Thr	0,062	Glutamine	Gln	0,032
Sérine	Ser	0,057	Tyrosine	Tyr	0,030
Acide Aspartique	Asp	0,053	Cystéine	Cys	0,025
Acide Glutamique	Glu	0,053	Méthionine	Met	0,012
Phénylalanine	Phe	0,045	Tryptophane	Try	0,012

L'unité de ces fréquences relatives de mutation des aminoacides est une unité arbitraire dépendant de la composition moyenne en aminoacides des protéines et du nombre de mutations de ces aminoacides observé dans l'arbre phylogénique des centaines de protéines étudiées

délétions probables suivantes : en positions 105, 124, 125, 126, 162, 174 et 200 (les molécules de prolactine étant prises comme référence) (Fig.42).

Il est intéressant de noter que toutes les délétions d'acides aminés observées, dans la séquence de la molécule d'hCS, sont les mêmes que celles de la plupart des hormones de croissance, ce qui rapproche encore la structure de cette hormone placentaire du groupe des hormones de croissance.

En plus des 48 acides aminés identiques et des diverses délétions observées dans l'étude des analogies entre les structures primaires de l'hCS et de l'hPRL, il est possible de mettre en évidence 20 acides aminés en positions homologues dont 53 correspondent à des mutations très fréquentes (*) et 27 à des mutations fréquentes (+) (Fig. 43). L'hCS et l'hPRL présentent donc 128 acides aminés homologues, ce qui correspond à une homologie structurale totale de 67% entre ces deux molécules. L'homologie entre l'hCS et l'hPRL est donc inférieure, d'environ 30%, à celle de l'hCS et de l'hGH (96%). Il existe entre les molécules d'hCS et d'hPRL 5 acides aminés différents à fréquence de mutation rare, et 58 autres acides aminés à taux de mutation tout à fait exceptionnel, d'après l'atlas des séquences protéiques de DAYHOFF (1972) (Fig. 43). Ce grand nombre d'acides aminés (23) à très faible mutabilité ponctuelle paraît correspondre au grand éloignement phylogénique des molécules de prolactines et d'hormones lactogènes placentaires. En revanche entre l'hCS et l'hGH, le petit nombre d'acides aminés (7) à très faible fréquence de mutation, indique soit une évolution très comparable des structures primaires de ces deux molécules, soit une divergence récente.

c) Comparaison des homologues de l'hCS et de l'oGH.

Les structures primaires de l'hormone lactogène placentaire humaine et de l'hormone de croissance ovine présentent 112 aminoacides identiques, soit 59% d'identité entre l'hCS et l'oGH, 13 aminoacides correspondant à des mutations fréquentes et 39 à des mutations très fréquentes ; il s'ensuit un taux d'homologie de 86% entre l'hCS et l'oGH.

Alors que le taux d'identité des séquences d'hCS et d'hPRL est seulement de 24%, celui de l'hCS et de l'oGH est environ le double.

Le taux d'homologie entre l'hCS et l'oGH est d'environ 20% supérieur à celui de l'hCS et de l'hPRL (67%).

En dépit des différences d'espèces, la molécule d'hormone lactogène placentaire humaine présente beaucoup plus d'analogie avec les hormones de croissance ovine, bovine ou équine (Tableau XII) qu'avec la prolactine humaine.

Cette molécule d'hormone placentaire présente donc une structure beaucoup plus proche de celle des molécules de la famille des hormones de croissance que de celle de la famille des prolactines.

L'analyse approfondie des homologues externes des séquences de ces diverses molécules démontre, de façon rigoureuse, les résultats suggérés par l'analyse globale des séquences.

3. Evolution moléculaire des hormones lactogènes placentaires. Comme nous l'avons vu précédemment, un certain nombre d'hormones lactogènes placentaires possèdent une puissante activité somatotrope, alors que d'autres ne la possèdent pas (Tableau I). D'après leur activité lactogène, qui est générale, on devrait rattacher le groupe des somatomammotrophines à celui des prolactines. Néanmoins, l'étude de la séquence de l'hCS, hormone pourtant presque dépourvue d'activité de croissance, a montré qu'il convenait plutôt de rattacher cette hormone au groupe des hormones de croissance. Les hormones placentaires apparaissent d'évidence comme un groupe hybride, du point de vue de leur activité.

En Embryologie, on a souvent démontré que "l'ontogénèse récapitule la phylogénèse." A la vue des molécules hybrides d'hormones lactogènes placentaires, on peut se demander si l'ancêtre moléculaire des hormones de croissance et des prolactines ne serait pas également une molécule hybride.

Il est important de rappeler que les Poissons, qui sont les ancêtres des Mammifères, possèdent déjà une prolactine et une hormone de croissance hypophysaire. De plus, ces hormones présentent également des caractères hybrides suggérant que les familles de prolactines et d'hormones de croissance proviennent d'une molécule ancestrale commune.

En effet, l'hormone de croissance d'un Poisson Téléostéen, le Tilapia, présente à la fois d'une part, des propriétés d'hormone somatotrope : croissance de jeunes Tilapia et de jeunes Saumons, réaction immunologique croisée avec l'hormone de croissance de Rat, activité, quoique faible, dans le test du tibia de Rat et, d'autre part, des propriétés comparables à celles de la prolactine ovine : adaptation à l'eau de mer de

jeunes saumons en favorisant l'excrétion du sodium plasmatique alors que la prolactine de *Tilapia* ne le permet même pas (FARMER & coll., 1976a, CLARKE & coll., 1977).

En revanche, la prolactine de *Tilapia*, également bien purifiée, favorise la rétention plasmatique du sodium chez le *Tilapia*. Cette activité osmorégulatrice est environ vingt fois plus élevée que celle de la prolactine ovine. Par contre, la prolactine de *Tilapia* est inactive in vitro dans la synthèse de caséine par le tissu mammaire de souris et n'a pas d'effet dans le test du jabot de Pigeon, mais elle présente une réaction immunologique croisée avec l'hormone de croissance de Rat, supérieure à celle de l'hormone de croissance de *Tilapia*. Elle est même plus active dans le test du tibia que la GH du *Tilapia*. Enfin, du point de vue de la structure primaire, la prolactine de *Tilapia* présente, comme toutes les hormones de croissance connues de Vertébrés, et à la différence de toutes les prolactines de Mammifères : 2 ponts disulfure au lieu de 3 et 1 seul résidu Tryptophane au lieu de 2 (FARMER & coll., 1977a, CLARKE & coll., 1977).

Il est intéressant de noter que beaucoup de propriétés et d'éléments de la structure primaire des hormones de croissance ont été conservés au cours de l'Evolution. Chez les Batraciens comme chez les Reptiles et les Oiseaux, il est possible de retrouver un grand nombre d'analogies structurales (FARMER & coll., 1976b). Par exemple, l'immunoréactivité des GH de Tortues aquatiques ou terrestres, de Canard ou de Crapaud est élevée en présence d'immunsérums anti-GH de Rat, ce qui suggère la conservation de déterminants antigéniques communs au cours de l'Evolution (FARMER & coll. 1976b).

Ces hormones de croissance sont actives dans le test du tibia de Rat, quoique en général moins puissantes que les hormones de croissance de Ruminants (FARMER & coll., 1976b, 1977b).

Au cours de l'évolution, le moment d'apparition du pouvoir lactogène des molécules de prolactine mérite d'être discuté ici, car certains résultats sont contradictoires.

En effet, bien qu'actifs dans le test du jabot de Pigeon (NICOLL et BERN, 1968), des extraits d'incubats d'hypophyses de Poissons, d'espèces variées, sont dépourvus d'activité lactogène en présence du tissu mammaire de Souris (NICOLL et coll., 1966, NICOLL et BERN, 1968, DONEEN, 1976, FARMER et coll., 1977a).

Par contre, chez la Lapine, des extraits d'hypophyses de Saumon sont capables de se lier de manière spécifique, quoique faiblement, aux récepteurs lactogènes du tissu mammaire (PRUNET et coll., 1977). De plus, récemment, PRUNET et coll. (1979) ont démontré que des extraits hypophysaires de Truite et de Saumon sont capables de stimuler une lactogénèse lors de multiples tests : activité lactose synthétase, synthèse de caséines, augmentation de la concentration des ARN messagers des caséines, histologie mammaire. Enfin, une préparation de Tilapia, fournie aimablement par BERN et inactive sur la glande mammaire de Souris, s'est révélée très active dans les divers tests de lactogénèse chez la Lapine (HOUDEBINE, communication personnelle).

En dépit des expériences négatives sur le tissu mammaire de Souris, la prolactine de Poissons Téléostéens est lactogène sur du tissu mammaire de Mammifère.

Il apparaît donc que la molécule de prolactine de Poisson possède la capacité de stimulation lactogène longtemps avant l'émergence de l'organe cible correspondant (NICOLL et coll. 1966). La liaison des prolactines de

130

[GH]	* <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Asp</u> <u>Leu</u> <u>Glu</u> <u>Gly</u> <u>Ile</u> <u>Gln</u> <u>Ala</u> <u>Leu</u> <u>Met</u> <u>Gly</u> <u>Glu</u> <u>Asp</u> <u>Gly</u> <u>Ser</u> <u>Pro</u> <u>Arg</u> <u>Thr</u> <u>Gly</u> <u>Gln</u>
[CS]	* <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Asp</u> <u>Leu</u> <u>Glu</u> <u>Gly</u> <u>Ile</u> <u>Gln</u> <u>Thr</u> <u>Leu</u> <u>Met</u> <u>Gly</u> <u>Arg</u> <u>Leu</u> <u>Glu</u> <u>Asp</u> <u>Gly</u> <u>Ser</u> <u>Arg</u> <u>Thr</u> <u>Gly</u> <u>Gln</u>
[PRL]	<u>Gln</u> <u>Asn</u> <u>Lys</u> <u>Arg</u> <u>Leu</u> <u>Glu</u> <u>Gly</u> <u>Met</u> <u>Glu</u> <u>Met</u> <u>Ile</u> <u>Val</u> <u>Gln</u> <u>Val</u> <u>His</u> <u>Pro</u> <u>Gly</u> <u>Thr</u> <u>Lys</u> <u>Glu</u> <u>Thr</u> <u>Glu</u> <u>Val</u>
	<u>Gln</u> <u>Thr</u> <u>Lys</u> <u>Asp</u> <u>Leu</u> <u>Glu</u> <u>Gly</u> <u>Ile</u> <u>Gln</u> <u>Thr</u> <u>Leu</u> <u>Met</u> <u>Gly</u> <u>Arg</u> <u>Leu</u> <u>Glu</u> <u>Asp</u> <u>Gly</u> <u>Ser</u> <u>Pro</u> <u>Arg</u> <u>Thr</u> <u>Gly</u> <u>Gln</u>
	<u>Gln</u> <u>Thr</u> <u>Lys</u> <u>Asp</u> <u>Leu</u> <u>Glu</u> <u>Gly</u> <u>Ile</u> <u>Gln</u> <u>Thr</u> <u>Leu</u> <u>Met</u> <u>Gly</u> <u>Arg</u> <u>Leu</u> <u>Glu</u> <u>Asp</u> <u>Gly</u> <u>Ser</u> <u>Pro</u> <u>Arg</u> <u>Thr</u> <u>Gly</u> <u>Gln</u>

[A]	<u>Glu</u> <u>Thr</u> <u>Lys</u> <u>Asp</u> <u>Leu</u> <u>Glu</u> <u>Gly</u> <u>Ile</u> <u>Gln</u> <u>Thr</u> <u>Leu</u> <u>Met</u> <u>Gly</u> <u>Arg</u> <u>Leu</u> <u>Glu</u> <u>Asp</u> <u>Gly</u> <u>Ser</u> <u>Pro</u> <u>Arg</u> <u>Thr</u> <u>Gly</u> <u>Gln</u>
	<u>Gln</u> <u>Thr</u> <u>Lys</u> <u>Asp</u> <u>Leu</u> <u>Glu</u> <u>Gly</u> <u>Ile</u> <u>Gln</u> <u>Thr</u> <u>Leu</u> <u>Met</u> <u>Gly</u> <u>Arg</u> <u>Leu</u> <u>Glu</u> <u>Asp</u> <u>Gly</u> <u>Ser</u> <u>Pro</u> <u>Arg</u> <u>Thr</u> <u>Gly</u> <u>Gln</u>

160

[GH]	<u>Ile</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Gln</u> <u>Thr</u> <u>Tyr</u> <u>Ser</u> <u>Lys</u> <u>Phe</u> <u>Asp</u> <u>Thr</u> * <u>Asn</u> <u>Met</u> <u>Arg</u> <u>Asn</u> <u>Asp</u> <u>Ala</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Asn</u> * <u>Tyr</u>
[CS]	<u>Ile</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Gln</u> <u>Thr</u> <u>Tyr</u> <u>Ser</u> <u>Lys</u> <u>Phe</u> <u>Asp</u> <u>Thr</u> * <u>Asn</u> <u>Met</u> <u>His</u> <u>Asn</u> <u>His</u> <u>Asp</u> <u>Ala</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Asn</u> * <u>Tyr</u>
[PRL]	* * <u>Tyr</u> <u>Pro</u> <u>Val</u> <u>Tyr</u> <u>Ser</u> <u>Lys</u> <u>Phe</u> <u>Asp</u> <u>Thr</u> * <u>Asn</u> <u>Met</u> <u>His</u> <u>Asn</u> <u>His</u> <u>Asp</u> <u>Ala</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Asn</u> * <u>Tyr</u>
	* * <u>Tyr</u> <u>Pro</u> <u>Val</u> <u>Tyr</u> <u>Ser</u> <u>Lys</u> <u>Phe</u> <u>Asp</u> <u>Thr</u> * <u>Asn</u> <u>Met</u> <u>His</u> <u>Asn</u> <u>His</u> <u>Asp</u> <u>Ala</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Asn</u> * <u>Tyr</u>
	* * <u>Tyr</u> <u>Pro</u> <u>Val</u> <u>Tyr</u> <u>Ser</u> <u>Lys</u> <u>Phe</u> <u>Asp</u> <u>Thr</u> * <u>Asn</u> <u>Met</u> <u>His</u> <u>Asn</u> <u>His</u> <u>Asp</u> <u>Ala</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Asn</u> * <u>Tyr</u>

[A]	<u>Ile</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Gln</u> <u>Thr</u> <u>Tyr</u> <u>Ser</u> <u>Lys</u> <u>Phe</u> <u>Asp</u> <u>Thr</u> <u>Leu</u> <u>Asn</u> <u>Met</u> <u>His</u> <u>Asn</u> <u>Asp</u> <u>Ala</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Asn</u> <u>Thr</u> <u>Gly</u> <u>Gln</u>
	<u>Ile</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Gln</u> <u>Thr</u> <u>Tyr</u> <u>Ser</u> <u>Lys</u> <u>Phe</u> <u>Asp</u> <u>Thr</u> <u>Leu</u> <u>Asn</u> <u>Met</u> <u>His</u> <u>Asn</u> <u>Asp</u> <u>Ala</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Asn</u> <u>Thr</u> <u>Gly</u> <u>Gln</u>

180

[GH]	<u>Gly</u> <u>Leu</u> <u>Leu</u> <u>Tyr</u> <u>Cys</u> <u>Phe</u> <u>Arg</u> <u>Lys</u> <u>Asp</u> <u>Met</u> <u>His</u> <u>Lys</u> <u>Val</u> <u>Glu</u> <u>Thr</u> <u>Tyr</u> <u>Leu</u> <u>Arg</u> <u>Val</u> <u>Met</u> <u>Lys</u> <u>Cys</u> <u>Arg</u> <u>Thr</u> <u>Gly</u> <u>Gln</u>
[CS]	<u>Gly</u> <u>Leu</u> <u>Leu</u> <u>Tyr</u> <u>Cys</u> <u>Phe</u> <u>Arg</u> <u>Lys</u> <u>Asp</u> <u>Met</u> <u>His</u> <u>Lys</u> <u>Val</u> <u>Glu</u> <u>Thr</u> <u>Tyr</u> <u>Leu</u> <u>Arg</u> <u>Val</u> <u>Met</u> <u>Lys</u> <u>Cys</u> <u>Arg</u> <u>Thr</u> <u>Gly</u> <u>Gln</u>
[PRL]	<u>Asn</u> <u>Leu</u> <u>Leu</u> <u>His</u> <u>Cys</u> <u>Leu</u> <u>Arg</u> <u>Arg</u> <u>Asp</u> <u>Ser</u> <u>His</u> <u>Lys</u> <u>Ile</u> <u>Asp</u> <u>Thr</u> <u>Tyr</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Asn</u> <u>Thr</u> <u>Gly</u> <u>Gln</u>
	<u>Asn</u> <u>Leu</u> <u>Leu</u> <u>His</u> <u>Cys</u> <u>Leu</u> <u>Arg</u> <u>Arg</u> <u>Asp</u> <u>Ser</u> <u>His</u> <u>Lys</u> <u>Ile</u> <u>Asp</u> <u>Thr</u> <u>Tyr</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Asn</u> <u>Thr</u> <u>Gly</u> <u>Gln</u>
	<u>Asn</u> <u>Leu</u> <u>Leu</u> <u>His</u> <u>Cys</u> <u>Leu</u> <u>Arg</u> <u>Arg</u> <u>Asp</u> <u>Ser</u> <u>His</u> <u>Lys</u> <u>Ile</u> <u>Asp</u> <u>Thr</u> <u>Tyr</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Leu</u> <u>Lys</u> <u>Asn</u> <u>Thr</u> <u>Gly</u> <u>Gln</u>

[A]	<u>Gly</u> <u>Leu</u> <u>Leu</u> <u>Tyr</u> <u>Cys</u> <u>Phe</u> <u>Arg</u> <u>Lys</u> <u>Asp</u> <u>Met</u> <u>His</u> <u>Lys</u> <u>Val</u> <u>Glu</u> <u>Thr</u> <u>Tyr</u> <u>Leu</u> <u>Arg</u> <u>Val</u> <u>Met</u> <u>Lys</u> <u>Cys</u> <u>Arg</u> <u>Thr</u> <u>Gly</u> <u>Gln</u>
	<u>Asn</u> <u>Leu</u> <u>Leu</u> <u>Tyr</u> <u>Cys</u> <u>Phe</u> <u>Arg</u> <u>Lys</u> <u>Asp</u> <u>Met</u> <u>His</u> <u>Lys</u> <u>Val</u> <u>Glu</u> <u>Thr</u> <u>Tyr</u> <u>Leu</u> <u>Arg</u> <u>Val</u> <u>Met</u> <u>Lys</u> <u>Cys</u> <u>Arg</u> <u>Thr</u> <u>Gly</u> <u>Gln</u>

[GH]	<u>Val</u> <u>Glu</u> <u>Ala</u> <u>Ser</u> <u>Cys</u> <u>Ala</u> <u>Phe</u> <u>OH</u>
[CS]	<u>Val</u> <u>Glu</u> <u>Gly</u> <u>Ser</u> <u>Cys</u> <u>Gly</u> <u>Phe</u> <u>OH</u>
[PRL]	<u>Tyr</u> <u>Asn</u> <u>Asn</u> <u>Asn</u> <u>Cys</u> <u>OH</u>
	<u>Tyr</u> <u>Asn</u> <u>Asn</u> <u>Asn</u> <u>Cys</u> <u>OH</u>

[A]	<u>Val</u> <u>Glu</u> <u>Ala</u> <u>Ser</u> <u>Cys</u> <u>Gly</u> <u>Phe</u> <u>OH</u>
	<u>Val</u> <u>Glu</u> <u>Ala</u> <u>Ser</u> <u>Cys</u> <u>Gly</u> <u>Phe</u> <u>OH</u>

Ces archétypes sont basés également sur les fréquences observées de la mutation des aminoacides (DAXHOFF, 1972).

Tableau XII, fig. 43.

Aminoacides incertains (), probables —, très probables ——. * délétions proposées.

[GH] Archétype de la famille des GH (déduit des alignements des GH et occasionnellement de celui des PRL)

[CS] Archétype de la famille des hormones lactogènes placentaires (basé sur la séquence de l'hOS, les archétypes des familles de GH et de PRL, et occasionnellement sur les compositions en aminoacides de l'OS et de la OCS)

[PRL] Archétype de la famille des prolactines (déduit des alignements des PRL et occasionnellement de celui des GH). Il n'a pas été tenu compte de la PRL de tilapia qui est encore trop imprécise.

[A] Archétype de la Superfamille des GH, PRL et CS. Il est déduit des archétypes de ces 3 familles.

Poissons aux récepteurs prolactiniques du tissu mammaire et leur capacité d'induction d'une lactogénèse résultent probablement d'une conformation comparable à celle des prolactines de Mammifères.

Bien que le nombre de séquences connues soit limité, l'homologie élevée des diverses familles de prolactines et d'hormones de croissance (Fig. 42) nous a incité à rechercher un modèle hypothétique d'archétype de la structure primaire de chacune de ces familles. L'archétype moléculaire de la famille des hormones de croissance (Fig. 44) est déduit des structures primaires des GH humaine, ovine, bovine, équine, et occasionnellement, des séquences de l'hCS et des prolactines.

Comme LI (1972), nous avons admis une délétion possible correspondant à 8-9 aminoacides au début de la séquence par analogie avec les molécules de prolactines. Une mutation par insertion dans les séquences des prolactines ne peut toutefois pas être écartée, surtout à la lumière des données récentes sur la prolactine de Tilapia (FARMER & coll., 1977a) qui paraît plus proche des modèles d'hormones de croissance. Mais la structure primaire de cette hormone est encore trop imprécise et son cas est encore trop unique.

Les aminoacides superposés (Fig. 44) correspondent à plusieurs possibilités en raison des alignements des séquences comparées. Les aminoacides entre parenthèses sont incertains. Les aminoacides soulignés d'un ou deux traits sont les plus probables et représentent environ 65% de la séquence hypothétique proposée.

L'archétype moléculaire de la famille des prolactines (Fig. 44) suit les mêmes principes que celui des hormones de croissance. Les aminoacides les plus probables correspondent à environ 67% de la structure primaire estimée.

Un archétype moléculaire de la famille des hormones lactogènes placentaires (Fig. 44) a pu encore être proposé. Il est basé essentiellement d'une part, sur la séquence de l'hCS qui est la seule somatomammotrophine dont la structure primaire soit actuellement connue et, d'autre part, sur les archétypes des familles de GH et de prolactines. Les compositions en aminoacides de l'oCS et de la bCS présentées par FELLOWS & coll. (1976), Tableau VII, s'écartent légèrement de celle de l'hCS ainsi que de celle de l'archétype des hormones lactogènes placentaires. Il est évidemment possible de modifier considérablement la structure de ce dernier en changeant les aminoacides les plus variables. Néanmoins, les données sur la structure des hormones placentaires sont à l'heure actuelle trop insuffisantes pour préciser davantage les caractéristiques éventuelles de leur molécule ancestrale.

D'après les compositions en aminoacides de l'oCS et de la bCS (Tableau VII), l'hormone lactogène placentaire ovine présente 192 aminoacides et l'hormone bovine 196 à 199 (FELLOWS & coll. 1976). Puisque le nombre d'acides aminés est très constant dans les familles d'hormones de croissance (191) et de prolactines (199) (Fig. 42), et que ces hormones bovine et ovine présentent une identité de 99% (WALLIS, 1975, Tableau XII), il est tout à fait curieux d'obtenir autant de différences dans les compositions en aminoacides des molécules d'oCS et de bCS (Tableau VIII). Ces compositions présen-

tent encore la particularité de posséder deux résidus Tryptophane et 3 ponts disulfure comme les molécules de prolactines de Mammifères, mais à la différence de l'hCS et de la prolactine de Tilapia.

D'autre part, il est tout à fait étonnant que l'oCS présente trois ponts S-S et seulement 192 aminoacides, car le troisième pont disulfure est toujours situé dans les molécules de prolactine précisément au niveau de la région des aminoacides absents dans les molécules ne contenant que 191 aminoacides (Fig.42). Des analyses structurales complémentaires apparaissent donc nécessaires pour résoudre ces problèmes intéressants de phylogénèse.

Il est encore intéressant de souligner que le résidu Cystéine en position 4 des prolactines, est aligné avec les résidus Val, Ile et Met des hormones de croissance et de l'hCS. Or la fréquence de mutation entre la Cystéine et ces résidus est particulièrement grande (Fig. 43).

Enfin, un modèle d'archétype moléculaire de la Superfamille des hormones de croissance, des prolactines et des hormones lactogènes placentaires a été déduit des archétypes de ces diverses familles (Fig. 44). Sa composition en aminoacides (Tableau VII) est assez conforme à celle des autres archétypes. Néanmoins, le nombre plus élevé de résidus Acide glutamique vient du fait que plusieurs délétions, correspondant à cet aminoacide, ont été prises en considération. Les aminoacides probables représentent environ 60% de la séquence primaire proposée.

Le nombre important des résidus (207) provient des "gaps" des différentes familles d'hormones. Le troisième pont disulfure des molécules de prolactines et le peptide correspondant, ont été considérés comme ne résultant pas d'une insertion, mais nous n'en avons pas la preuve. En raison du très faible taux de mutation des

résidus Tryptophane (Tableau XIII), nous avons considéré que deux résidus Tryptophane étaient présents dans l'archétype de la Superfamille des GH, des prolactines et des somatomammotrophines chorioniques. La composition en aminoacides de l'oCS et de la bCS va d'ailleurs dans ce sens, mais cette hypothèse reste en contradiction avec la structure de la prolactine de Tilapia. A partir de ces archétypes moléculaires, dont l'existence serait très ancienne, puisque ces hormones peuvent avoir été présentes chez les Poissons primitifs, NIALL et coll. (1972) suggèrent qu'un petit peptide ancestral a pu être à l'origine de ces molécules hormonales. En effet, ces auteurs ont signalé quatre zones peptidiques homologues entre elles dans les molécules d'hCS, d'hGH et de prolactine ovine. Les aminoacides sont en positions identiques, ou bien correspondent à des substitutions de codons très favorables. Pour la molécule d'hCS (Fig. 37), NIALL & coll. proposèrent les peptides homologues suivants à partir de l'acide aminé N-terminal : 15-32, 92-106, 128-146 et 162-179, correspondant à ceux de l'hGH (Fig. 39) (15-32, 92-109, 126-146 et 162-179) et à ceux de la prolactine ovine (Fig. 38) (26-41, 94-105, 138-153 et 171-188). Mais les séquences de ces hormones ont subi un certain nombre de corrections depuis cette date. Il est toutefois évident qu'il est relativement aisé de faire correspondre des peptides à partir du moment où l'on admet une quantité de gaps non négligeable. Nous avons également vu que le taux d'homologie entre ces hormones était très important notamment entre l'hGH et l'hormone lactogène placentaire humaine. Néanmoins, surtout par analogie avec les molécules d'immunoglobulines ou d'hémoglobines, il est très probable que la Superfamille des hormones lactogènes placentaires, des hormones de croissance et des prolactines provienne d'un peptide primor-

Tableau XIV

Distance dans l'Evolution (en unités PAM[•])
des différentes molécules d'hormones

	hCS	hGH	oGH	bGH	eGH	hPRL	oPRL	pPRL
1. hCS	-							
2. hGH	16,5	-						
3. oGH	60	50	-					
4. bGH	58	48	1	-				
5. eGH	58	50	9,4	8,3	-			
6. hPRL	217	200	208	208	226	-		
7. oPRL	193	185	200	192	200	35,5	-	
8. pPRL	200	246	200	200	208	26,2	21	-

•unité PAM : Mutation Ponctuelle Acceptable d'après le Code Génétique et la Sélection Naturelle

Elles sont obtenues par la conversion du % de différence des aminoacides entre deux protéines, d'après la table de DAYHOFF (1972)

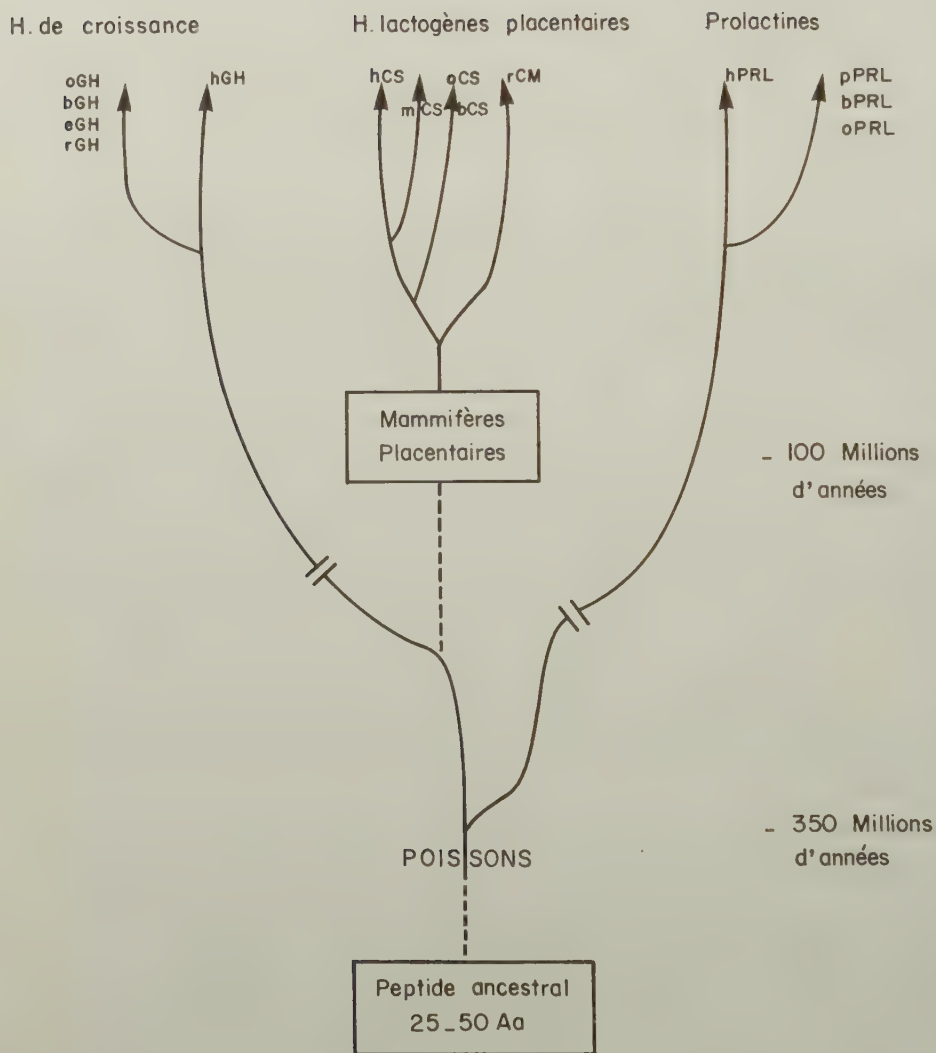
hGH, oGH, bGH, eGH : GH humaine, ovine, bovine, équine

hPRL, oPRL, pPRL : Prolactine humaine, ovine, porcine

dial plus court (25 à 50 aminoacides) à la suite de duplications géniques à partir d'un cistron originel. En effet, la duplication des gènes est considérée comme un moyen habituel de diversification génétique au cours de l'Evolution des Vertébrés (DAYHOFF, 1972).

Il est probable aussi que le peptide ancestral ait possédé une activité biologique et qu'il l'ait partiellement conservée en dépit des pressions de la Sélection naturelle (NIALL & coll. 1971).

L'ensemble des considérations d'analogies structurales étudiées ci-dessus, nous a conduit à schématiser l'évolution moléculaire des hormones lactogènes placentaires, des prolactines et des hormones de croissance dans l'arbre phylogénique de la Fig. 45. Nous proposons un modèle intermédiaire entre ceux de WALLIS & DAVIES (1976) et de DAYHOFF (1976) qui ne considèrent pas les hormones lactogènes placentaires comme un groupe particulier, et celui de FELLOWS & coll. (1976) qui ne rattache pas de façon préférentielle ces hormones au groupe des somatotrophines. Nous donnons néanmoins, dans le tableau XIV, la distance évolutive estimée en unités P.A.M. des différentes molécules d'hormones. Ces mutations ponctuelles acceptables (P.A.M.), d'après le Code génétique et la pression de la Sélection Naturelle, sont obtenues par conversion du pourcentage des différences en aminoacides entre deux protéines, selon la table de conversion de DAYHOFF (1972). Mais ces distances évolutives varient avec la vitesse de mutation des protéines et ne sont pas directement convertibles en unités de temps. Alors que l'on peut considérer que l'Homme est apparu sur la Terre il y a quelques millions d'années (avec les Australopithèques) (COFFENS, 1976), on considère que les



45

Evolution moléculaire des familles d'hormones lactogènes, d'hormones de croissance et de prolactines.

autres Primates, les Ruminants, le Cheval et le porc auraient été présents il y a environ 10 millions d'années (DAYHOFF, 1972, COFFENS, 1976). Le rayonnement des mammifères aurait eu lieu il y a environ 75 millions d'années, celui des Reptiles du Secondaire entre 100 et 150 millions d'années, et celui des Poissons osseux il y a environ 350 millions d'années (SCHAUENBERG, 1976).

Il s'ensuit que le moment de la divergence des molécules de prolactines et d'hormones de croissance, et donc de leurs archétypes, peut être estimé à environ 350 millions d'années. Le moment de l'apparition des molécules d'hormones lactogènes placentaires à partir d'une duplication du cistron des hormones de croissance, pourrait se situer à environ 75 millions d'années. L'apparition des poissons osseux étant estimée à plus de 350 millions d'années, celle du peptide parent de la Superfamille des prolactines, des somatotropines et des hormones lactogènes placentaires pourrait se situer également à cette période.

4. Relation structure-fonctions des molécules d'hormones lactogènes placentaires

La localisation des sites biologiques, des sites récepteurs et des déterminants antigéniques est encore mal connue à la fois dans les molécules de prolactines, d'hormones de croissance et d'hormones lactogènes placentaires.

a) Rôle des ponts S-S. La rupture d'un seul pont S-S n'entraîne apparemment aucune perte d'activité biologique, la rupture des deux ponts provoque, d'après NERI & coll. (1972), une baisse de l'activité lactogène dans le test du jabot de Pigeon, et abolit, d'après BREUER (1969), l'activité de croissance de l'hCS. Mais d'après LI (1977), les ponts S-S ne sont pas indispensables à toute activité de croissance, car il a pu retrouver une importante activité somatotrope en combinant de manière non covalente un fragment N-terminal (1-134) avec un fragment C-terminal d'hCS (141-191). Dans ces fragments, les ponts S-S ont été réduits et bloqués en constituant des dérivés carbamidométhylés.

Le pont S-S de la petite boucle (182-189) (Fig.37) de la molécule d'hCS ne paraît pas être impliqué dans l'activité biologique car il est responsable de la formation des dimères stables d'hCS. Ceux-ci possèdent autant d'activité immunologique et biologique et de capacité de liaison aux récepteurs membranaires que les monomères d'hCS (SCHNEIDER & coll., 1977).

b) Localisation de l'activité de croissance.

D'après les études faites sur les hormones de croissance, le noyau actif de croissance serait très probablement dans la région N-terminale 1-134 (KOSTYO, 1976) et principalement dans le peptide 96-134, d'après les travaux du groupe de SONENBERG.

- La région 1-134 des hormones de croissance

Après hydrolyse de la molécule d'hGH par la plasmine, le peptide 1-134 présente encore, dans le test du tibia, 15% d'activité de la molécule intacte.

D'après le groupe de KOSTYU (1974), ce peptide, quoique presque inactif in vivo par voie sous-cutanée ou intrapéritonale, présente, lorsqu'il est injecté par voie intraveineuse, une activité, analogue à l'hGH, sur la production de somatomédine par des Rats hypophysectomisés. De plus in vitro, ce peptide est aussi actif (sur des bases molaires) que l'hGH sur l'incorporation des aminoacides dans les protéines ou sur le transport du glucose ou des aminoacides dans le diaphragme isolé de Rats hypophysectomisés. En revanche, le reste de la molécule paraît totalement inactif. Si le site biologique d'activité de croissance est bien situé dans le fragment 1-134, il semble que le reste de la molécule d'hormone native puisse contribuer à la structure tertiaire de ce site et à sa protection contre une rapide inactivation in vivo (REAGAN & coll., 1975).

- Le peptide 96-134 des hormones de croissance

D'après les résultats de l'hydrolyse trypsique de la molécule d'hormone de croissance bovine, le site actif pourrait se situer principalement dans le fragment 96-134, homologue de la région 94-134 de l'hGH. En effet, ce peptide de PM 5 000 est actif dans le test du gain de poids et le test du tibia de Rats hypophysectomisés, quoique nettement moins que la bGH (YAMASAKI & coll., 1970, 1972). Il est également actif in vitro sur la lipolyse (SWISLOCKI & coll., 1970). Il est toutefois particulièrement vulnérable à la dégradation protéolyti-

que in vivo, car son activité chez l'Homme est inférieure à 1/100 de celle de l'hGH, sur des bases molaires.

BLAKE & LI (1973) ont synthétisé le peptide homologue de l'hGH (95-136), mais son activité est également très faible, inférieure à 1% de celle de l'hGH, sur des bases molaires. NIAII & coll. (1973) trouvent même que le peptide (95-133) qu'ils ont synthétisé, est dépourvu d'activité. Les auteurs soulignent toutefois que la solubilité de ce peptide étant très réduite en solution aqueuse, cela pourrait expliquer ce manque d'activité.

L'ensemble de ces expériences montre la difficulté que l'on a pour préciser le site biologique d'activité de croissance.

- Site d'activité de croissance et hCS

La localisation de l'activité de croissance des hormones lactogènes placentaires est probablement homologue à celle des hormones de croissance.

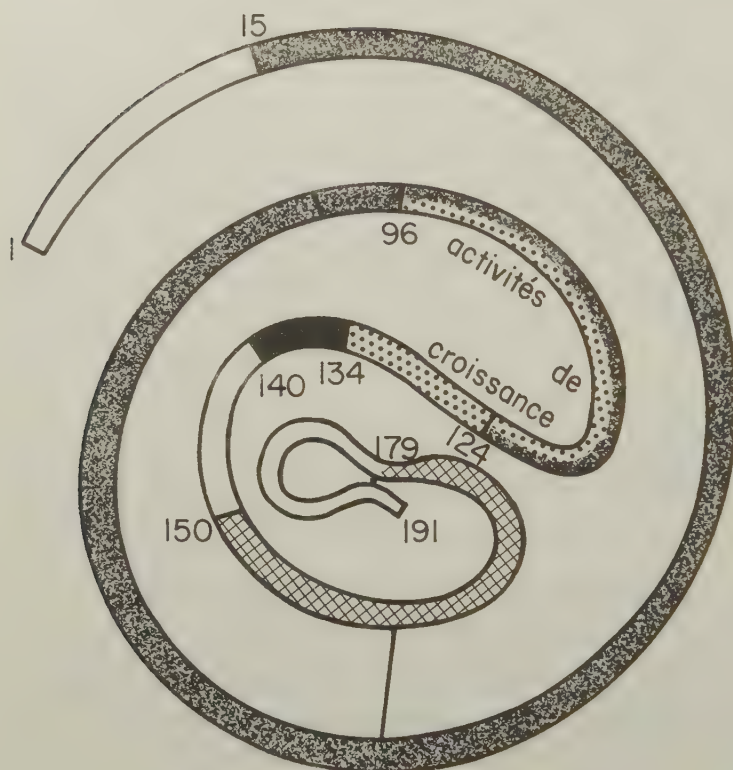
En raison de la très faible activité de croissance de l'hCS, cette molécule ne convient guère pour étudier ce site biologique, la connaissance des structures des hormones lactogènes placentaires de Ruminants est par suite précieuse. Néanmoins, LI (1978) a réalisé récemment des recombinaisons hétérologues entre le fragment 1-133 d'hCS et le fragment 141-191 d'hGH, de manière non covalente. Comme l'hCS, la molécule hybride ne présente pratiquement pas d'activité. Ces résultats confirment également l'absence d'autres sites actifs de croissance dans le dernier tiers de la molécule d'hGH. En revanche, lorsque le fragment 1-134 d'hGH est couplé au peptide 141-191 d'hCS, cette molécule hybride est

très active dans le test du tibia de Rat hypophysectomisé. Néanmoins, cette activité ne correspond qu'à environ 50% de celle d'un hybride non covalent d'hGH (1-13) et (141-191) qui est aussi actif que la molécule native (LI & coll., 1977). Cette baisse d'activité, due au fragment d'hCS 141-191, est étonnante, et suggère que les deux aminoacides qui diffèrent (Histidine 153 et Méthionine 179) du segment homologue d'hGH pourraient jouer un rôle inhibiteur sur l'activité de croissance.

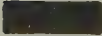
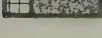
Lorsque l'on compare les alignements des séquences de la Fig.42, l'on voit que le résidu Méthionine 179 de l'hCS est en position homologue avec un résidu Isoleucine de l'hGH et un résidu Valine des hormones de croissance ovine, bovine, équine. Ces trois aminoacides sont hydrophobes. Cette analogie ne permet pas d'expliquer les grandes différences de fonction entre les molécules d'hCS et d'hormones de croissance.

En revanche, le résidu Histidine 153 de l'hCS, qui est basique, a pour homologue un résidu Acide aspartique dans toutes les hormones de croissance. Cette différence de charge entre l'hCS et les hormones de croissance pourrait être la cause principale de l'importante inhibition de l'activité de croissance de l'hormone hybride hGH-hCS, recombinée. Cette différence de charges n'existe peut-être pas entre les hormones lactogènes placentaires de Ruminants et les hormones de croissance.

Les différences importantes d'activités de croissance entre les molécules d'hormones lactogènes placentaires pourraient donc également résulter d'acides en position inhibitrice. Ceux-ci pourraient entraîner, par exemple, une microconformation inhibitrice de la liaison de la molécule avec son site récepteur. Une faible activité de croissance pourrait donc résulter d'un mauvais contact du site biologique avec son récepteur que d'une absence de site proprement dit. Cette



hGH

-  activité de croissance (96-134 ou 1-134)
-  activités métaboliques diverses (15-124)
-  135-140 peptide inhibiteur.
-  (6-124 + 150-179) bGH → synthèse protéique
-  activité lactogène (1-134)

possibilité pourrait expliquer l'étonnante homologie de l'hCS et de l'hGH même dans la région du site actif, et pourtant, la très faible activité de croissance de l'hCS.

Enfin, cette possibilité n'exclut pas l'existence d'acides aminés inhibiteurs dans la région du site actif de croissance.

- La région 135-140 des hormones de croissance.

Il existerait d'ailleurs une zone peptidique inhibitrice dans les molécules d'hormones de croissance. En effet, SINGH & coll. (1974) isolèrent de l'hypophyse, une forme modifiée d'hGH, trois fois plus active que l'hGH intacte dans le test du tibia : son activité de croissance était de 6,9 U.I./mg au lieu de 2 U.I./mg.

Or la carte peptidique de l'hGH révéla que le peptide 135-140 était absent, ce qui indiquait que la forme la plus active d'hGH n'était pas celle de la molécule intacte. De plus, cette forme modifiée était indistinguishable de l'hormone intacte par dosage radioimmunologique. D'ailleurs, en hydrolysant des préparations d'hGH par la plasmine, YADLEY & CHRAMBACH (1974) et CHRAMBACH & coll. (1974) ont obtenu des isohormones qui présentaient une augmentation considérable des activités somatotropes.

Le groupe de KOSTYC (1974) démontra également, par digestion de l'hGH par la plasmine, que le peptide (1-134 + 141-191) était aussi actif que l'hGH dans tous les tests étudiés.

c) Localisation des activités métaboliques

Le clivage des molécules d'hormones de croissance au niveau des résidus Méthionine par le bromure de cyanogène, montre que le peptide 6-124 de bGH stimule la lipolyse alors que les fragments 125-149 et 150-179 sont inactifs (NUTTING & coll., 1970).

Les peptides 5-125 d'hormone de croissance de Porc, et 15-125 d'hGH, stimulent faiblement la synthèse protéique dans le foie et le muscle diaphragmatique de Rats hypophysectomisés. Le peptide 15-125 d'hGH stimule

également le transport des aminoacides et du glucose dans le diaphragme isolé de Rats hypophysectomisés. Mais aucun de ces peptides ne stimule la production de somatomédine (NUTTING & coll., 1972) ce qui suggère une dissociation nette entre le site actif de croissance et la région des activités métaboliques.

Dans les molécules d'hormone de croissance bovine et ovine, le fragment (6-124 + 150-179) stimule la synthèse protéique in vitro, mais ne permet pas la production de somatomédine par les Rats hypophysectomisés (NUTTING & coll., 1970, KOSTYO, 1974).

La Fig. 46 résume les principaux résultats ci-dessus.

Comme les prolactines de Poissons, l'hormone lactogène placentaire humaine présente une activité, quoique faible, sur la perte d'eau des vessies de Poissons Téléostéens. De même l'hGH possède une activité osmorégulatrice qui est située dans le fragment 1-134 (DONEEN & coll., 1977), le fragment 141-191 étant inactif.

d) Localisation de l'activité lactogène

La localisation du site biologique lactogène est encore plus mal connue que celle du site d'activité de croissance.

Comme pour l'activité de croissance, il existe une zone peptidique inhibitrice de l'activité lactogène. En effet, SINGH & coll. (1974) isolèrent de l'hormone une forme modifiée d'hGH environ sept fois plus active (14,5 U.I./mg) dans le test du jabot de Pigeon que la forme native. La carte peptidique de l'hydrolysât tryptique révéla l'absence du peptide 135-140. Lors d'hydrolyse enzymatique par la plasmine des préparations d'hGH, YADLEY & CHRAMBACH (1974), et CHRAMBACH & coll. (1974) obtinrent des isohormones qui possédaient une activité lactogène nettement augmentée. Il apparaît donc que cette zone peptidique inhibe à la fois l'activité de croissance et l'activité lactogène, et que l'hormone native n'est pas la forme la plus active. On peut même se demander s'il ne faudrait pas parler, pour l'hCS ou l'hGH, comme pour l'insuline et la proinsuline, de prohormone, la forme la plus active étant légèrement hydrolysée par la plasmine sanguine ou tissulaire. Néanmoins, d'après DONEEN & coll. (1977), l'hGH hydrolysée par la plasmine (donc dépourvue des résidus 135-140), ne présente pas d'augmentation d'activité sur la mamme mammaire de Souris par rapport à celle de l'hGH native.

Une forme d'activation des hormones lactogènes placentaires pourrait aussi résulter de leur désamidation. En effet, la désamidation de l'hCS semble produire une faible, mais statistiquement significative, augmentation de l'activité lactogène (HANDWERGLER & SHERWOOD, 1974).

Ces formes d'activation de l'activité lactogène par élimination enzymatique d'un petit peptide, ou par désamidation, ont été aussi observées à propos de la prolactine humaine.

Les expériences de modifications partielles de la prolactine ovine montrent que l'oxydation par l'eau oxygénée de quatre résidus Méthionine (24,53,105,130) (Fig.41) ne provoque qu'une très légère baisse d'activité biologique mesurée par le test du jabot de Pigeon (HOUGHTEN & LI 1976). En revanche, l'oxydation des sept résidus Méthionine de la molécule, entraîne une perte importante d'activité. De même, celle de l'hCS (5 Méthionines sur 6) conduit à une importante baisse d'activité (HOUGHTEN & LI, 1977).

L'iodation limitée (2 molécules d'iode par molécule) n'abaisse pas l'activité biologique de la prolactine, alors que l'iodation plus poussée (10 molécules d'I₂ par molécule de prolactine) diminue nettement l'activité lactogène mesurée par le test du jabot de Pigeon (KAWAUCHI & coll., 1977). Il est intéressant de noter que la réactivité chimique des 7 résidus Tyrosine n'est pas identique : ce sont les Tyrosine 44 et 195 (Fig.41) qui présentent une forte réactivité. Le résidu 44 tend particulièrement à former des dérivés disubstitués. Il est en position homologue (Fig.42) dans les molécules de prolactine ovine, d'hormone lactogène placentaire humaine et d'hormone de croissance humaine. Ces deux hormones humaines présentent une activité lactogène qui est nettement moins importante que celle de la prolactine ovine.

Sur la Fig.42, le résidu Tyrosine 51 de l'hGH et de l'hCS, analogue au Tyrosine 44 de la prolactine, présente également la plus forte réactivité dans ces molécules, quoique ne formant que des dérivés mono-substi-

tués (KAWACHI & LI, 1974). Les dérivés mono ou disubstitués apparaissent ces trois résidus nommés sont les suivantes :

<u>HO</u>	asp	glu	<u>lys</u>	<u>arg</u>	ser	thr
<u>OH</u>	asp	<u>lys</u>	<u>arg</u>	<u>lys</u>	ala	ala
<u>OH</u>	glu	glu	<u>lys</u>	<u>lys</u>	ser	thr

Dans ces trois molécules, le résidu tyrosine est situé en position adjacente à un ou deux acides aminés basiques (arg, lys) constituant un environnement favorable à la formation de dérivés mono ou disubstitués, d'après KAWACHI & LI (1974).

Ces Tyrosines 44 et 54 sont très probablement marquées lors des radiocidations en raison de leur réactivité, mais elles ne sont pas directement impliquées, comme nous l'avons vu, dans l'activité lactogène. La perte de l'activité biologique de certaines hormones radiocidées résulterait essentiellement d'une trop forte dégradation des traceurs dans les dosages radiométriques ou radioimmunologiques (KAWACHI & LI, 1977).

En dépit de la différence d'activité lactogène des molécules d'HO, d'OH et d'hormones de croissance, la structure secondaire de ces hormones est très comparable puisqu'elle contient 45 à 60 d'hydrophobicité (LI & LI, 1975; LI & LI, 1976; LI & LI, 1977; LI & LI, 1978; LI & LI, 1979). Il en résulte également que le site lactogène des molécules d'hormones lactogènes re-centaires ou de prolactines peut admettre de modifications subtiles d'un ou de quelques résidus d'acides aminés (LI & LI, 1978).

- La région 1-134 des hormones lactogènes.

L'hydrolyse de l'hGH montre que le peptide 1-134 présente une activité de 10-20% dans le test du jabot de Pigeon (LI & GRAF, 1974), et une activité d'environ 10% dans la synthèse de caséine in vitro par la glande mammaire de Souris (DONEEN & coll., 1977). Par contre, le fragment 141-191 d'hGH ne présente pas d'activité lactogène significative (DONEEN & coll., 1977).

Le site d'activité lactogène paraît donc situé dans la même portion 1-134 que celui d'activité de croissance.

La rupture de la molécule de prolactine ovine par la plasmine entre les résidus Met 53 et Ala 54 (Fig. 41) donne deux fragments PRL-(1-53) et PRL-(54-199) inactifs. La recombinaison de ces fragments sans liaison covalente restaure seulement 2% de l'activité totale de la molécule dans le test du jabot de Pigeon (BIRK & LI, 1978) ce qui est en accord avec les observations ci-dessus montrant une baisse d'activité lactogène par la rupture des deux ponts disulfure (BREUER, 1969). Il apparaît donc que la conformation tertiaire complète de la prolactine ovine n'est pas rétablie par des liaisons non covalentes entre les fragments 1-53 et 54-199, à la différence des recombinaisons de fragments d'hormone de croissance (LI & coll., 1977). Cette liaison peptidique 53-54 pourrait être essentielle à l'activité du site actif lactogène.

Il est intéressant de souligner que le comportement de la molécule recombinée est presque identique à celui de la molécule native dans les tests physiques de conformation par dichroïsme circulaire et dans les tests

immunologiques, car cela suggère que de petites modifications, notamment dans la zone de rupture (53-54) peuvent jouer un rôle essentiel dans la perte d'activité biologique.

Lorsque l'on compare les homologies externes des différentes hormones lactogènes (Fig. 42) et notamment dans la zone de la liaison Met-Ala de la prolactine ovine, on voit que cette région correspond à celle du résidu Tyrosine le plus exposé, comme nous le verrons plus loin (résidu 51 pour l'hGH et l'hCS et 44 pour les prolactines), et qu'il existe une différence importante entre les prolactines, l'hCS et l'hGH d'une part, et les autres hormones de croissance d'autre part : la présence d'un "gap" chez ces dernières, au niveau de la Phénylalanine, en position homologue 53 de la prolactine ovine (Fig. 42). Aucune des hormones de croissance ovine, bovine, équine, qui présentent une absence de résidu, ne possède d'activité lactogène.

Puisque les hormones de croissance de ruminants ne peuvent se fixer sur les sites récepteurs lactogènes (MARTAL, 1978, P_{17x}), un tel changement conformationnel pourrait expliquer cette différence essentielle de propriétés. En raison des capacités de liaison des hormones lactogènes placentaires de Ruminants à la fois aux sites de croissance et aux sites lactogènes, ces hormones pourraient ne pas présenter le gap relevé ci-dessus. Cette hypothèse serait intéressante à vérifier.

e) Localisation des déterminants antigéniques

L'hormone lactogène placentaire humaine présente une réaction immunologique croisée partielle avec l'hGH, en immunodiffusion (MAC LAREN, 1962, KAPLAN & GRUMBACH, 1964). Ces résultats suggèrent donc deux séries de déterminants antigéniques dont un commun entre l'hCS et l'hGH.

- Déterminant antigénique propre à l'hCS.

La présence de plusieurs sites antigéniques dans la molécule d'hCS fut également clairement démontrée par les tests de précipitation quantitative (II, 1972). A la suite de modifications chimiques de l'unique résidu Tryptophane (Trp) de l'hCS, situé en position 86, l'hormone devient incapable de se lier à ses anticorps homologues, mais conserve sa capacité de liaison vis-à-vis des immunsérums anti-hGH (NERI & coll., 1973). Il s'ensuit que le résidu Tryptophane est impliqué dans un déterminant antigénique homologue, mais il ne fait pas partie du déterminant commun aux deux hormones.

47

Région possible d'un déterminant antigénique propre à l'hCS

	65	70	75	80
<u>hCS</u>	Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Gln Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile	<u>Glu</u>		
<u>hGH</u>	Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Gln Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile	<u>Gln</u>		
	85	90	95	
<u>hCS</u>	Ser <u>Trp</u> Leu <u>Glu</u> Pro Val <u>Arg</u> Phe Leu Arg Ser			
<u>hGH</u>	Ser <u>Trp</u> Leu <u>Glu</u> Pro Val <u>Gln</u> Phe Leu Arg Ser			

Il est curieux de noter (Fig. 47) que les deux acides aminés qui entourent le résidu Tryptophane sont deux résidus Acide glutamique (en position 84 et 88) pour l'hCS et une Glutamine (84) et un Acide glutamique (88) pour l'hGH, alors que la portion 85-95 de la séquence primaire de ces deux molécules présente une très forte homologie.

Il existe aussi deux aminoacides différents en position 91 (l'Arginine pour l'hCS, et la Glutamine pour l'hGH).

L'asymétrie de charge entre les deux aminoacides en position 84 est néanmoins tout à fait remarquable et pourrait expliquer, sans nécessairement exclure un rôle annexe aux aminoacides en position 91, une micro-conformation tertiaire différente entre les deux molécules d'hormones et l'absence de déterminant antigénique commun dans cette région. La présence de la Proline en position 89 signe d'ailleurs un arrêt de la structure en hélice α . Les repliements du reste de la chaîne peptidique peuvent également intervenir dans la conformation du déterminant antigénique.

Il est intéressant de souligner que la région du Tryptophane est particulièrement hydrophobe, car on peut dénombrer 13 acides aminés hydrophobes (Leucine, Isoleucine, Valine, Tryptophane, Phenylalanine) sur 20 dans la portion peptidique 75 à 93.

On admet généralement que la zone du Tryptophane 84 est située à l'intérieur des molécules d'hormone de croissance, d'hCS ou de prolactines. Le dernier

tiers de la molécule correspondant à l'extrémité COOH, plus hydrophile, est, par suite, plus exposé au solvant et présenterait un rôle protecteur des sites actifs.

- Déterminant antigénique commun à l'hCS et l'hGH

Après hydrolyse enzymatique par la plasmine (LI, 1978), le fragment 141-191 d'hCS ne présente pas de réaction immunologique croisée avec l'antisérum anti-hGH. Par contre, les peptides 1-133 d'hCS et 141-191 d'hGH sont réactifs avec cet immunsérum.

Il existe donc au moins un déterminant antigénique propre à l'hGH dans la portion terminale de la molécule (141-191) et le déterminant antigénique commun à l'hCS et l'hGH se trouve dans la portion 1-133. D'après ce que nous avons vu précédemment, le déterminant commun ne se trouve pas dans la zone du Tryptophane. Il est difficile, à l'heure actuelle, de préciser davantage sa localisation.

- Déterminant antigénique propre à l'hGH

Les résultats précédents montrent l'existence d'un déterminant antigénique propre à l'hGH dans la position 141-191. Cela n'exclut d'ailleurs pas l'existence de déterminant antigénique propre à l'hCS dans cette région. Comme nous l'avons déjà souligné, les portions 141-191 d'hCS et d'hGH présentent une très forte homologie : il n'existe que deux aminoacides différents respectivement en position 153 et 179. Les deux résidus en position 179 (Méthionine pour l'hCS et Isoleucine pour l'hGH) sont tous deux hydrophobes. Par contre, les deux résidus en position 153, sont, l'un basique (l'Histidine pour l'hCS) et l'autre acide (l'Acide aspartique pour l'hGH).

A la lumière de nos connaissances sur les sites de liaison d'enzymes comme la trypsine ou la chymotrypsine, ces modifications de charges dans des zones extrêmement homologues peuvent expliquer les différences immunologiques observées.

Remarquons toutefois que l'hGH présente encore un déterminant propre dans la région 95-136. Celle-ci est moins immunoréactive que le fragment 141-191, qui est lui-même encore moins réactif que le fragment 1-134 (CLARK & coll. 1974).

- Déterminants antigéniques comparés des hormones lactogènes placentaires

L'hCS présente une identité immunologique avec l'hormone lactogène placentaire de Singe (mCS) vis-à-vis d'un immunsérum anti-hGH (KAPLAN & GRUMBACH, 1964). Il existe donc un déterminant antigénique commun entre la mCS, l'hCS et l'hGH. En revanche, il n'existe pas de réaction immunologique croisée entre les hormones lactogènes placentaires de Ruminants et l'hCS ou l'hGH (MARTAL, 1978, P_{18x}). Il en est d'ailleurs de même entre toutes ces hormones et les molécules de prolactines.

2ème PARTIE

" Le développement de l'embryon représente l'un des problèmes les plus difficiles et les plus provoquants de la Biologie.

Longtemps restée descriptive, cette étude utilise depuis quelques années les méthodes de la Biologie moléculaire chaque fois qu'elle le peut. Mais nos connaissances sur les mécanismes qui sous-tendent le développement de l'embryon restent encore très limitées".

GROS, JACOB et ROYER, 1979.

CHAPITRE VI

Lieu de synthèse de l'oCS

INTRODUCTION

On a cru, pendant longtemps, en raison des résultats de l'histologie classique, que le placenta des ruminants présentait une structure syndesmochoriale : les villosités choriales foetales paraissaient en contact direct avec le tissu conjonctif maternel. En fait, la microscopie Electronique a permis de distinguer, tout au long de la gestation, une juxtaposition nette de l'épithélium chorionique d'origine foetale à l'épithélium utérin maternel de structure syncytiale (BJORKMAN, 1965, LAW & coll. 1969, STEVEN 1973, STEVEN & coll. 1978). Néanmoins, les diverses fonctions des cellules placentaires restent encore très mal connues. Il existe notamment un type cellulaire tout à fait particulier qui a été décrit depuis longtemps par les Placentologues et qui a soulevé beaucoup d'interrogations : ce sont les grandes cellules binucléées du chorion foetal (ASCHENFON 1906, WINSATT 1951, BOSCHER 1969).

Indépendamment des travaux d'histologie placentaire, nous avons observé, lors de l'étude des conditions d'extraction de l'oCS, que l'hormone lactogène placentaire ovine était sécrétée essentiellement (à 85%) par la partie foetale des placentômes (MARTAL & IACROIX 1978, P_{19x}). Il nous a donc paru intéressant de préciser le lieu de la synthèse de l'oCS. Grâce à une préparation hautement purifiée d'oCS et à la production d'immunsérums spécifiques anti-oCS, il nous a été possible d'établir, en collaboration avec Maurice DUBOIS pour la technique d'immunofluorescence, la localisation placentaire de cette hormone (DUBOIS & coll. 1976, C₁₂, MARTAL & coll. 1977, P_{19x}).

1973-1974

4. Echantillons de tissus

Les échantillons de placenta sont prélevés au niveau de la jonction des cotylédons maternels et fœtaux chez des Brebis au 120ème jour de gestation. Des fragments de 2 à 3 mm sont fixés pendant 48h dans une solution de BOUIN-HOLLANDE (dépourvue d'acide acétique, contenant 10% (v/v) d'une solution saturée de Chlorure de Mercure $HgCl_2$, puis lavés pendant 48h à l'eau courante et inclus dans de la paraffine. Des fragments de placentas humains et bovins sont fixés, à des stades variés de gestation, par les mêmes procédés, et utilisés comme témoins.

5. Purification de l'oCS

L'oCS a été purifiée par une variante de la méthode décrite ci-dessus en détail : extraction des cotylédons avec du KCl 0,3 M, pH 9,5 pendant 4 h à 4°C, précipitation des grosses impuretés à pH 4,5, précipitation du matériel actif par le sulfate d'ammonium à 60% de saturation, chromatographie sur DEAE Séphadex dans du tampon borate de sodium, 10 mM, pH 8, filtration sur Ultrogel (LKB, Aca 4/4, 4x140 cm équilibré dans du tampon bicarbonate d'ammonium 0,025 M, KCl 0,1 M) et finalement chromatographie sur CM Séphadex dans du tampon phosphate 10 mM, pH 5,0 (gradient de 0,15 M à 0,5 M de KCl).

6. Immunsérum anti-oCS

Les immunsérums ont été préparés en injectant de l'oCS (1 mg/injection) mélangée à de l'adjuvant de Freund (alternativement complet ou incomplet) à des lapins de race Néo-Zélandaise par voie sous-cutanée (1 à 2 fois par mois pendant 4 mois). Les antisérums anti-oCS furent testés par la méthode d'immunodiffusion d'Ouchterlony, décrite dans le chapitre V, en présence d'oCS purifiée et de préparations d'hormones variées (hCS, oH, oG, oC, oD).

4. Immunsérums témoins : Immunsérums anti-bGH, anti-oPRL, anti-ACNH₂₅₋₃₉, anti-hCG, anti-PMSG, anti-LH-RH, anti-sous-unités LH α et anti-sous-unités LH β , anti-somatostatine. Les spécificités de ces antisérums en présence d'antigènes variés, homologues ou hétérologues, ont été décrites ailleurs par M. DUBOIS (DUBOIS, 1969, DUBOIS & KOLODZIEJCZYK, 1975, DUFOUY & DUBOIS, 1975).

5. Réactions immunocytologiques

Ces réactions ont été réalisées selon la méthode d'immunofluorescence indirecte : des coupes de tissu cotylédonnaire sont incubées pendant de courtes périodes (1h) en présence d'immunsérum de Lapin anti-oCS (dilution : 1/40). Les coupes sont ensuite exposées pendant 30 mn environ à des γ globulines de Mouton anti-immunoglobulines de Lapin, conjuguées à de l'isothiocyanate de fluorescéine (Institut PASTEUR, Paris) à la dilution de 1/80 et enfin colorés au Bleu Evans (1/10 000).

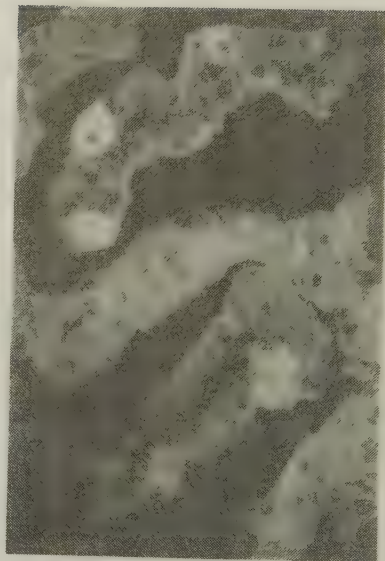
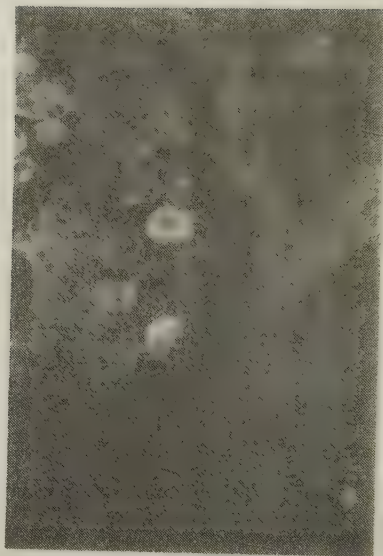
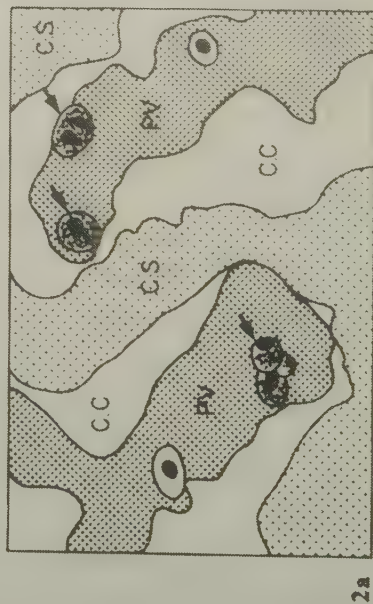
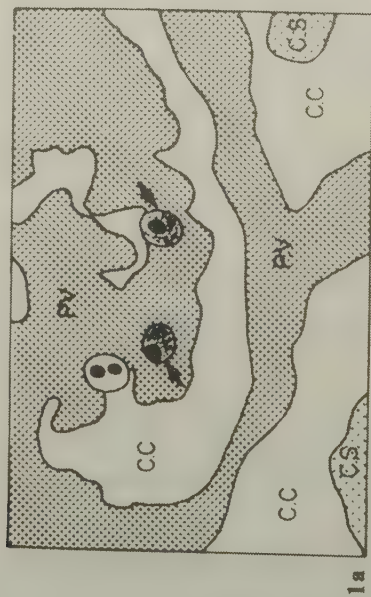
6. Critère de spécificité de la réaction immunocytologique.

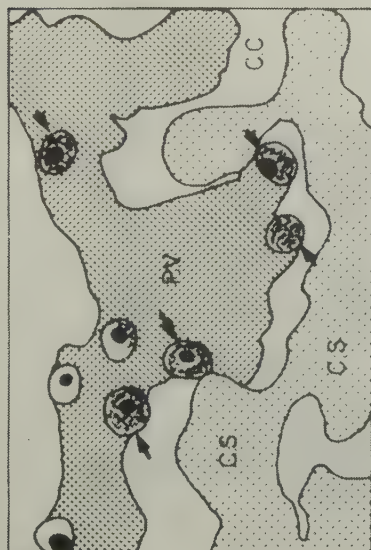
En plus des témoins habituels, tels que l'exposition à des sérums normaux de Lapin ou à des γ globulines conjuguées sans aucun traitement préalable des tests d'inhibition sont utilisés en saturant les anticorps avec un excès d'antigènes :

a) saturation des anticorps anti-oCS avec de l'antigène homologue purifié (oCS 400 μ g/ml, immunsérum v/v).

b) saturation d'anticorps anti-oCS avec de la prolactine ovine (8 mg PS 10 N.I.H./ml d'antisérum v/v) ou avec de l'hormone de croissance bovine (5 mg bGH N.I.H./ml d'antisérum v/v).

FIG.48 - PLUSIEURS ASPECTS DE LA LOCALISATION IMMUNOCYTOCHIMIQUE
DE L'OCS DANS LE PLACENTA DE BŒFIS.

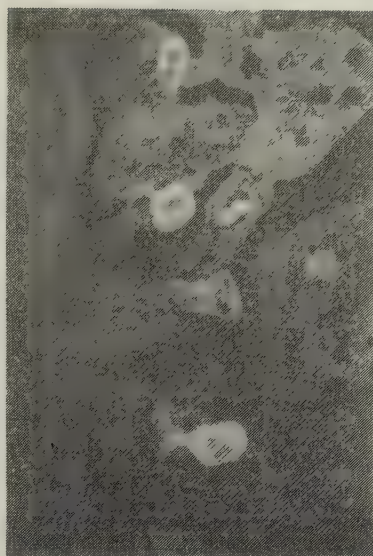
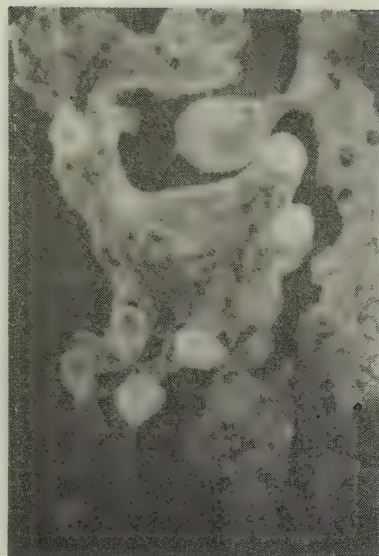




3a

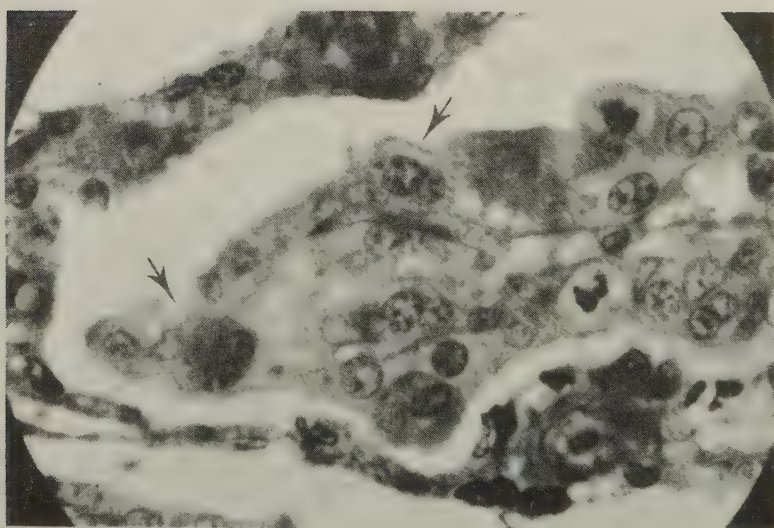
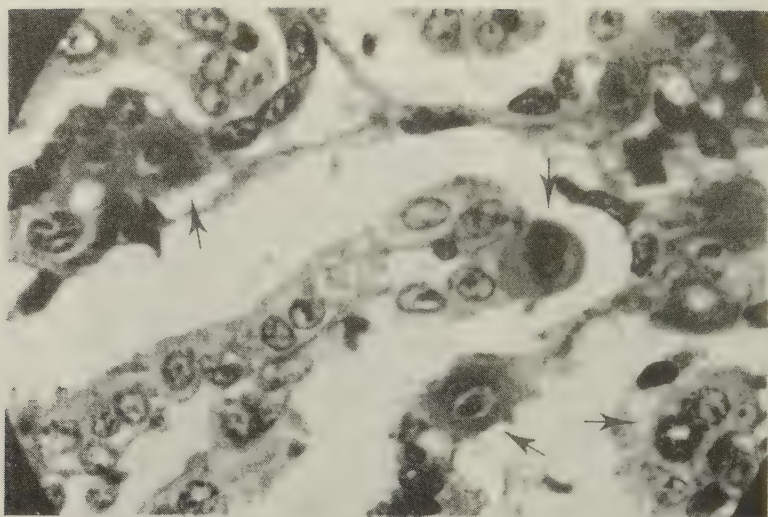


4a



DETAILS HISTOLOGIQUES REDESSINES A PARTIR
DES COUPES DE TISSUS.

REPRODUCTION PHOTOGRAPHIQUE DIRECTE DES COUPES
DE TISSUS X 100. PV : VULVE PLACENTAIRE
CS : STROMA COTYLEDONNAIRE
CC : COTYLEDONNAIRE



Cellules binucléées PAS positives

7. Cytologie

Les coupes de placentas sont colorées par une exposition séquentielle au PAS^{*}/hématoxyline-safran, après que la réaction immunocyto logique ait été réalisée afin de contrôler la spécificité cytologique des structures immunoréactives.

RESULTATS

La Figure 48 présente des coupes variées de placentômes ovins prélevés à la période de sécrétion maximale d'oCS.

Les villosités placentaires (P.V.) de l'épithélium chorionique monostratifié, constitué de petites cellules à coloration PAS négative, pénètrent à l'intérieur des cryptes cotylédonnaires (CC) de l'épithélium maternel (Stroma cotylédonnaire, CS). Selon le niveau des coupes, les villosités placentaires fœtales ou le stroma cotylédonnaire (CS) maternel apparaissent plus ou moins abondants. L'agrandissement de l'espace formé par les cryptes cotylédonnaires (CC) est un artéfact dû à la fixation. Les grandes cellules mono ou binucléées des villosités placentaires monostratifiées prennent la coloration PAS. Elles ne présentent pas toutes d'immunofluorescence, vraisemblablement à cause de la concentration variable de l'antigène cellulaire (oCS). Cependant, les anticorps anti-oCS qui deviennent fluorescents après traitement des coupes aux immunoglobulines de Brebis anti- γ globulines de Lapin, se lient exclusivement aux grandes cellules mono ou binucléées (marquées d'une flèche).

* PAS: Acide Périodique - Base de Schiff

Comme nous l'avons mentionné au Chapitre IV, aucune réaction immunologique croisée n'est observée entre l'oCS et les diverses hormones suivantes : hCS, hGH, bGH, oGH et oPRL. Seul l'immunsérum anti-oCS a été efficace pour révéler une immunofluorescence positive et cette réaction est inhibée exclusivement par l'oCS. Enfin aucun immunsérum témoin (anti-ACTH, anti-hCG, anti-PMSG, anti-LH-RH, anti-LH, anti-sous-unités LH α et LH β , antisonatostatine) ne présente d'immunofluorescence dans nos conditions expérimentales.

DISCUSSION

En raison des particularités des placentas de femme et de brebis, il n'est pas surprenant que la localisation de leur hormone lactogène diffère considérablement.

Dans l'espèce humaine, le placenta, de forme discoïdale et non cotylédonnaire, présente une structure hémochoriale. L'hormone lactogène placentaire est sécrétée par le cytoplasme du syncytiotrophoblaste des villosités choriales (SCIARRA & coll., 1963, CONTRACTOR & coll., 1977). Ce syncytiotrophoblaste provient d'ailleurs du cytotrophoblaste (MIDGLEY & coll., 1963). La gonadotrophine chorionique humaine, l'hCG, a été également localisée, de manière spécifique, dans le syncytiotrophoblaste (MIDGLEY & FLEMER, 1962, IKORICOFF & CEDARD, 1976). Chez la brebis, l'utilisation d'immunsérums anti-oCS spécifiques et de préparations d'oCS purifiée a permis de localiser par immunofluorescence, les cellules productrices d'oCS. Elles appartiennent aux villosités placentaires qui s'enfoncent dans les cryptes cotylédonnaires maternelles, ce qui explique les faibles activités lactogène ou somatotrope, observées lors de l'extraction des cotylédons maternels. Ce sont de grandes cellules

les mono ou binucléées, à coloration PAS positive, situées au niveau de l'épithélium unistratifié des villosités chorales. Cette localisation des cellules à oCS, à la limite des cotylédons foetaux et maternels, peut expliquer que cette hormone puisse être facilement sécrétée à la fois du côté foetal et du côté maternel. Des auteurs Néo-Zélandais, REDDY & WATKINS (1978) viennent de confirmer nos résultats sur la localisation du lieu de synthèse de l'oCS. En raison des grandes analogies histologiques des cotylédons bovins et ovins, il est probable que le lieu de synthèse de l'hormone lactogène placentaire bovine, se trouve également au niveau des cellules binucléées de l'épithélium monostratifié des villosités chorales (MARTAL, 1979, P_{25x}).

L'apparition des cellules binucléées observée dès le 17ème jour de gestation chez la Brebis (BOSHIER, 1969) est compatible avec nos connaissances sur la sécrétion de l'oCS. En effet, cette hormone a été détectée, par dosage radiorécepteur, à partir du 16ème jour, dans des extraits de trophoblastes (MARTAL & DJIANE, 1977, P_{15x}, MARTAL & LACROIX, 1978, P_{21x}). La cinétique d'apparition de l'oCS est représentée Fig. 68. Les cellules binucléées dériveraient, d'après ASSHETON (1906), WIMSATT (1951), LAWN & coll.(1969) des cellules principales mononucléées du trophoblaste. Les cellules binucléées ressemblent, du point de vue morphologique, aux cellules sécrétrices de l'adénohypophyse en raison de leurs abondantes gouttelettes denses aux électrons, de leur appareil de Golgi et de leur ergastoplasme très développés.

Ces cellules binucléées sont capables de migrer des tissus foetaux vers les tissus maternels d'après les observations d'ASSHETON (1906), WIMSATT (1950, 1951), d'AMOROSO (1952), de BOSHIER (1969), de BASS & coll.(1977) et de STEVEN & coll.(1978).

Cette capacité de migration des cellules binucléées est comparable à celle de certaines cellules du Système Réticulo-Histiocytaire (S.R.H.). STEVEN & coll. (1978) considèrent que les cellules binucléées seraient capables de traverser l'épithélium utérin maternel, de perdre leur membrane cytoplasmique et de décharger leurs produits de sécrétion dans le syncytium épithélial utérin. Cette hypothèse est en accord avec les points de vue d'ASSHETON et WIMSATT qui considèrent que les cellules binucléées sont les précurseurs directs du syncytium épithélial maternel. BOSCHER (1969) constate d'ailleurs que cette migration est plus visible au cours des stades précoces de la gestation.

La signification physiologique de la migration des cellules binucléées n'est pas encore claire. Dans le placenta hémochorial de la Femme et des autres Primates, les grosses molécules protéiques telles que l'hCG, la mCG, l'hCS ou la mCS passent directement du trophoblaste au sang maternel circulant. Les concentrations d'hCS sont d'ailleurs beaucoup plus élevées chez la Mère que chez le Fœtus (KAPLAN & GRUMBACH, 1965). Par contre, dans les espèces à placentation épithéliochoriale, la présence de l'épithélium utérin peut nécessiter un mécanisme différent de transport foeto-maternel.

Chez la Jument, la PMSG est élaborée au début de la gestation par les tissus de la ceinture chorionique (ALLEN & HOOR, 1972) mais cette hormone apparaît dans le sang maternel seulement lorsque les cellules trophoblastiques fœtales ont migré du côté maternel, dans les coupes endométriales (ALLEN & coll., 1973; HAMILTON & coll., 1973).

Puisque nous avons montré que les cellules binucléées sont la source de l'hormone lactogène placentaire ovine, la migration de ces cellules à travers la

barrière placentaire pourrait représenter un mécanisme normal du transport de l'oCS du foetus vers la mère,
d'après STEVEN et coll. (1978).

Le contrôle de la migration des cellules binucléées
est mal connu mais il pourrait être hormono-dépendant. En effet la section de la tige pituitaire (BASS et coll. 1977) et la surrénalectomie (BARNES et coll. 1976) du foetus d'agneau provoquent la migration des cellules binucléées au niveau de l'accolement des épithéliums chorioniques et maternels. De grands pseudopodes, émis par ces cellules, sont observables dans le syncytium épithélial maternel (STEVEN et coll. 1978). Cette migration cellulaire ne paraît pas être influencée par des perfusions foetales d'ACTH ou de cortisol. Après hypophysectomie, les cellules binucléées ne migrent pas dans les tissus maternels et ne sont pas au contact direct avec l'épithélium syncytial maternel. A la suite de ces expériences, STEVEN et coll. (1978) ont proposé une hypothèse de contrôle endocrinien de la migration des cellules binucléées :

l'hypophyse serait capable de sécréter un Facteur de Mobilisation des Cellules Binucléées (F.M.C.B.), de nature non encore identifiée. Cette hormone serait sous l'influence d'un Facteur Inhibiteur d'origine hypothalamique, comparable à celui qui inhibe la prolactine, la GH ou la MSH (SCHALLY et coll. 1978). Ce Facteur Inhibiteur hypothalamique (F.M.C.B.-I.F.) serait lui-même stimulé par les surrénales. Lors de la section de la tige pituitaire foetale, l'inhibition hypothalamique serait levée, ce qui permettrait la migration des cellules binucléées sous l'influence du F.M.C.B. Puisque les surrénales stimuleraient le F.M.C.B.-I.F., l'injection de cortisol ou d'ACTH au foetus normal ne modifierait pas la migration des cellules binucléées, déjà inhibées par les surrénales.

Bien que ces hypothèses soient séduisantes, l'inconvénient essentiel de ce type d'observations est que les résultats ne sont absolument pas quantitatifs, et l'appréciation des données ultrastructurales conserve une importante valeur subjective en raison du choix de coupes et de photographies.

Une autre hypothèse, plus simple que la précédente, peut être également émise. La migration des cellules binucléées pourrait être favorisée par la sécrétion d'un Activateur du Plasminogène qui serait hormono-dépendante. En effet, la migration de nombreuses cellules (granulocytes, cellules tumorales, ...) à travers les tissus peut s'expliquer par la synthèse de cet Activateur qui a la propriété de transformer le plasminogène inactif en plasmine. Cette protéase est très abondante dans la plupart des tissus et est peu spécifique. On a mis récemment en évidence dans les Macrophages et les polynucléaires, un Activateur du Plasminogène (HAMILTON et al., 1976) dont la production est habituellement inhibée par les glucocorticoïdes (VASSALI et al., 1976). La surrénalectomie supprimerait cette inhibition. Puisque l'hypophysectomie empêche la migration et la section de tige la favorise, la prolactine pourrait être un facteur de stimulation de la production de l'Activateur. La LH stimule bien, lors de l'ovulation, la production de l'Activateur du Plasminogène par les cellules folliculeuses (BEERS et al., 1975; STRICKLAND et BEERS, 1976).

Les mécanismes du contrôle de la sécrétion des cellules binucléées sont encore mal connus. Nous les discuterons plus loin à propos du contrôle de la sécrétion de l'oCS. Notons toutefois que ces cellules binucléées sécrètent probablement d'autres produits que l'oCS. En effet, l'hétérogénéité des grains de sécrétion des cellules binucléées, observée au microscope électronique (STEVEN & coll., 1978) peut le suggérer. De plus, ces cellules prennent la coloration PAS, caractéristique des glycoprotéines, alors que les hormones lactogènes placentaires, comme les prolactines et les hormones de croissance hypophysaires, ne sont pas des glycoprotéines. La réaction PAS positive des cellules binucléées, sécrétrices d'oCS, ne paraît donc pas corrélée à la présence d'oCS. Enfin, en raison de la faible sensibilité de la méthode, l'absence de réaction d'immunofluorescence entre les coupes de placentas ovins et divers antisérums (anti-ACTH, anti-PMSG, anti-LH, anti-sous-unités α et β ,

anti-hCG et anti-somatostatine) ne signifie pas nécessairement que de telles hormones n'existent pas dans les placentas de Ruminants.

Nous avons mis en évidence, par dosage radio-récepteur, une gonadotrophine chorionique ovine (LACROIX & MARTAL, 1979, P₂₇) mais elle ne présente de réaction immunologique croisée ni avec les LH ovine et humaine, ni avec l'hCG. Dans le placenta humain, on a pu montrer l'existence d'hormones analogues à la TSH (HENNEN & coll., 1969; HERSHMAN & STARNES, 1969, 1971), à l'ACTH (GENAZZANI & coll., 1975) à la LH (l'hCG), à la prolactine et à l'hormone de croissance (l'hCS), au LH-RH (SILER-KHODR & KHODR, 1978; GIBBONS & coll., 1975) et au T-RH (GIBBONS & coll., 1975). RIDDICK & KUSMIK (1977) et GOLANDER & coll., (1978) ont démontré récemment que la prolactine amniotique est synthétisée et sécrétée par le tissu décidual chorionique humain. Les techniques de chromatographie, d'électrophorèse, d'immunologie et de dosage radiorécepteur ne permettent pas de la distinguer de la prolactine hypophysaire. On a même pu considérer le placenta comme une sorte de complexe hypothalamo-hypophysaire. Nos résultats sur l'étude du placenta ovin par immunofluorescence ne nous permettent toutefois pas de vérifier cette hypothèse.

CHAPITRE VII

Production et régulation

de la sécrétion d'oCS

Pour apprécier les rôles physiologiques de l'oCS, il est nécessaire de connaître tout au long de la gestation ses taux sériques circulants. En raison de son caractère bifonctionnel (Chapitre II), il est indispensable d'estimer à la fois son activité prolactinémique et son activité somatotrope, en les distinguant de celles de la prolactine et de l'hormone de croissance.

Les variations sériques comparées de ces diverses hormones seront donc étudiées à la fois chez la mère, le foetus et dans les divers compartiments placentaires (placenta, liquide amniotique et liquide allantoïdien). La vitesse de disparition sanguine de l'oCS et le taux de sécrétion de cette hormone seront déterminés après hystérectomie. La synthèse placentaire d'oCS sera analysée en relation avec la croissance du placenta. En raison de la fréquence de jumeaux chez la Brebis, nous rechercherons une méthode de diagnostic de gémellité par dosage de l'oCS.

En dépit d'une littérature scientifique déjà abondante sur les hormones lactogènes placentaires, les conditions de la régulation de leur sécrétion sont peu connues (SUWA & FRIESEN, 1969 ; BELLEVILLE & coll., 1973). Alors que la sécrétion de la prolactine peut être réduite par l'hormone lactogène placentaire (NAGASAWA & coll., 1976), le contrôle par feedback de la sécrétion d'une hormone placentaire par la prolactine n'a jamais été décrit. Nous présenterons dans ce chapitre un modèle de variations de la production d'oCS chez des brebis rendues hypoprolactinémiques par l'usage d'une drogue : la bromocryptine.

MATERIELS ET METHODES

1 - Animaux

- Un groupe de 146 brebis gestantes de race Pré-alpes du Sud est utilisé à de multiples fins.

- Un groupe de 40 brebis gestantes de même race est traité par la bromocryptine (2-bromo- -ergocryptine, CB 154, Sandoz, 1 mg deux fois par jour à 12 h d'intervalle, par la voie sous-cutanée). Les injections commencent à 70 jours de gestation et continuent jusqu'à l'abattage des animaux à des stades variés de gestation.

- Un groupe de 5 brebis est hystérectomisé entre le 110ème et le 140ème jour de gestation.

Les brebis sont anesthésiées au Fluothane (ICI) et laparotomisées le long de la ligne blanche. Les vaisseaux utérins sont ligaturés avec du fil de lin et le col utérin est sectionné après une double transfexion avec du fil de soie.

Toutes les brebis gestantes proviennent de lots synchronisés au moyen d'éponges vaginales imprégnées d'un progestène (30 mg de 17 -acétoxy-9 -fluoro-11 -hydroxyprogestérone : SEARLE, ROBINSON, 1965 ; SHELTON, 1965 ; ROBERTS, 1966.

Les éponges vaginales sont laissées en place 14 jours puis 300 UI de PMSG (SEARLE) sont injectées le 14ème jour. Les brebis ainsi synchronisées sont saillies deux fois le jour de l'oestrus.

- Enfin, un troupeau de 376 brebis, présumées gestantes à la suite d'un dosage de la progestérone sanguine à 19 jours, est utilisé pour des déterminations sanguines d'oCS.

2 - Prélèvements

- Les échantillons de sang maternel sont prélevés à la veine jugulaire des brebis dans des tubes Vacutainer (BECTON-DICKINSON) dépourvus d'anticoagulants. Les échantillons sanguins des brebis traitées par la bromocryptine

sont prélevés environ 12 h après la dernière injection de CB 154.

- Les échantillons de sang foetaux et les liquides amniotiques et allantoïdiens sont prélevés au moment de l'abattage puis centrifugés et stockés à - 15°C jusqu'au moment des dosages.

- Les cotylédons placentaires foetaux sont séparés des cotylédons maternels, séchés, pesés et décongelés à - 15°C jusqu'au moment de l'extraction. Le traitement par la bromocryptine n'affecte ni la facilité de la délivrance ni l'aspect des cotylédons.

3 - Extraction de l'oCS

La méthode d'extraction a été précédemment décrite (Chapitre I). Des aliquotes de placenta à des stades variés de gestation sont décongelés et homogénéisés dans du tampon phosphate (0,01M, pH 7,6) contenant du KCl (0,3M) et filtré à travers de la gaze. Après une agitation de 4 h à pH 9,5, les échantillons sont centrifugés à 12000g pendant 30 mn. Les activités oCS sont dans le surnageant. Les placentas des animaux traités et des témoins sont extraits rigoureusement dans les mêmes conditions et testés à différentes dilutions en parallèle, de façon à assurer une parfaite reproductibilité.

Les variations de la durée d'extraction, du pH, de la température ou de la force ionique ne conduisent pas à un meilleur rendement en matériel actif.

4 - Incubation de sérums de brebis

Des plasmas de brebis gestantes (riches en oCS) ou de brebis non gestantes surchargées en hormone de croissance (bGH PENTEX) ou en prolactine ovine (NIH) à raison de 500 ng/ml sont incubés 5 h à 39°C afin de tester l'activité protéolytique sérique.

5 - La détermination du Volume plasmatique de la Brebis a été réalisée selon la méthode d'HODGETT (1961) au Bleu Evans chez les brebis hystérectomisées. Environ 50 ml d'une solution de Bleu Evans (0,5 ‰) sont injectés rigoureusement dans la veine jugulaire gauche. Des prélèvements sanguins sont ensuite pratiqués toutes les 5-10 mn dans l'autre jugulaire et la concentration plasmatique de Bleu Evans est mesurée par la densité optique à 680 nm. La concentration au temps zéro (t_0) est ensuite extrapolée et cette valeur est utilisée pour estimer la répartition du colorant dans le corps de l'animal. Le rapport de la quantité injectée à la concentration du bleu au temps t_0 donne le Volume plasmatique de l'animal. Le volume sanguin est déterminé en fonction de l'hématocrite.

6 - Taux de production de l'oCS

Il est donné par la formule :

$$T.P.(mg/j) = V_d (ml) \times k \times c (mg/ml)$$

où le taux de production de l'hormone (T.P.) est proportionnel au produit du Volume V_d de distribution plasmatique de l'hormone, de la constante de turnover k et de la concentration plasmatique c de l'oCS. La disparition sanguine d'une substance de concentration c se traduit par une exponentielle décroissante de la forme :

$$c = c_0 \cdot e^{-kt}$$

ou après transformation en logarithmes décimaux :

$$\log c = -0,43 kt + c_0$$

La demi-vie de l'hormone est proportionnelle à la pente de cette droite selon la relation :

$$t_{1/2} = \frac{\log 2}{k} \quad (\log 2 = 0,693)$$

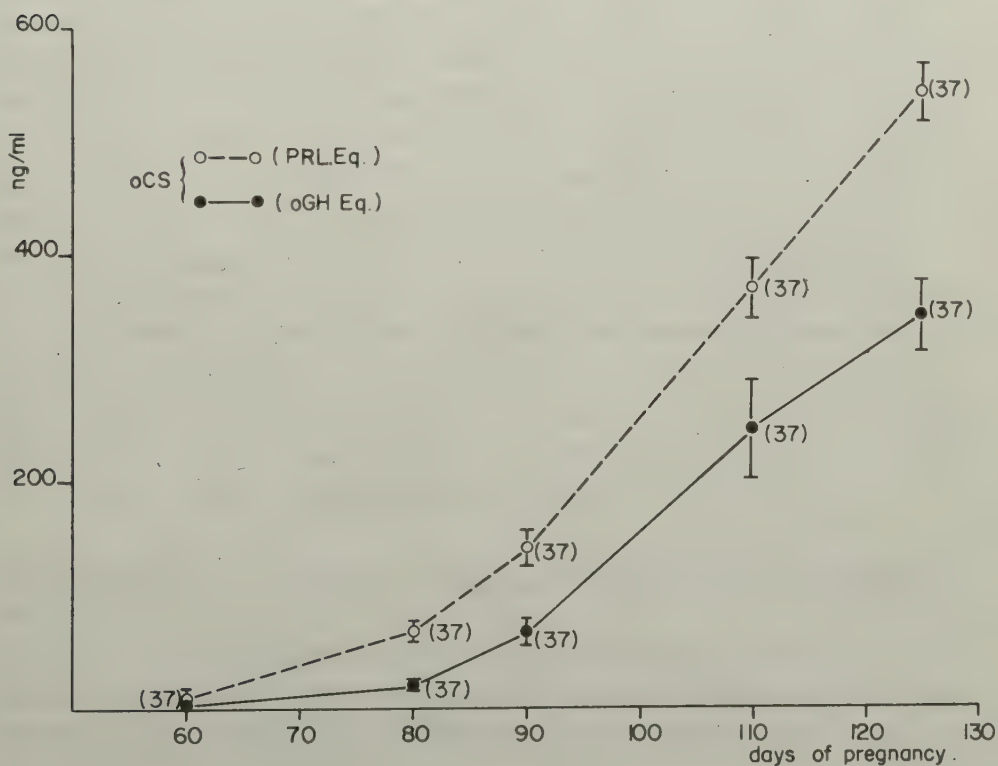
Cette constante k correspond à la constante de turnover de l'hormone (HERMANN & GREMY, 1969). Par hystérectomie, nous supprimons la source de sécrétion d'oCS à 110 et 140 jours, stades où la concentration d'oCS est élevée. Nous pouvons ainsi mesurer la demi-vie et calculer le taux de sécrétion et la clearance métabolique de l'oCS (MCR : Metabolic Clearance Rate) selon la relation

$$T.P. \text{ (mg/j)} = MCR \text{ (l/j)} \times c \text{ (mg/l)}$$

7 - Le dosage radiorécepteur de l'activité lactogène et de l'activité somatotrope de l'oCS a été décrit au Chapitre I ainsi que les dosages radioimmunologiques de l'oGH et de la prolactine ovine.

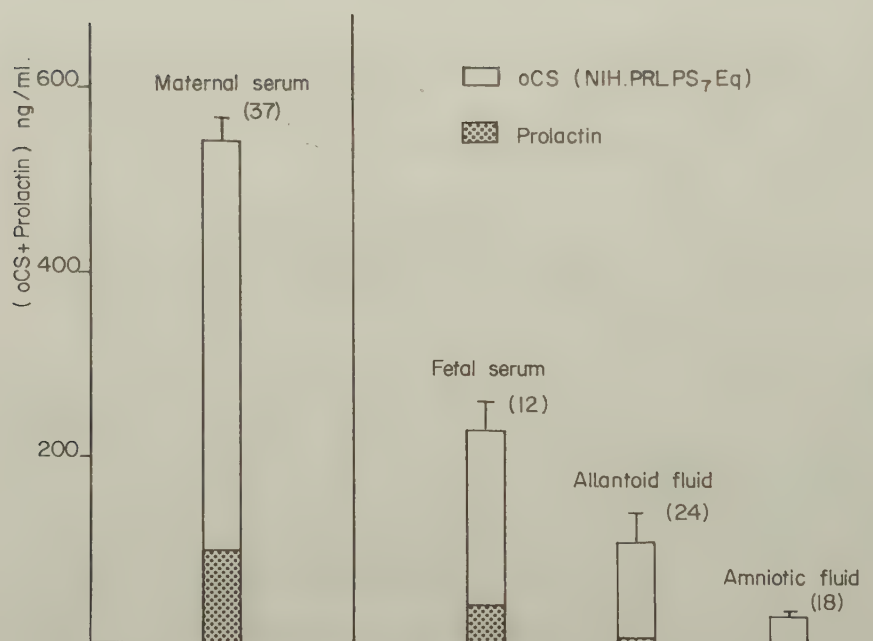
(50)

Comparison between lactogenic and growth hormone activities in maternal blood from day 60 to 125 of pregnancy



51

Comparison of total lactogenic activities between maternal and fetal fluids on Day 120 of pregnancy.



RESULTATS

1 - Evolution des taux sériques d'oCS maternelle

Avant le 60ème jour de gestation, l'oCS est indé-
tectable dans le sang maternel, par dosage radiorécepteur.
Les concentrations sériques d'oCS ont été déterminées du
60ème jour de gestation à la mise-bas.

Les activités somatotrope et lactogène de l'oCS sont syn-
chrones (Fig 50) ce qui est en bon accord avec le caractère
bifonctionnel de l'hormone (Chapitre II). Les concentrations
sériques d'activité somatotrope varient entre le $1/3$ et les
 $2/3$ de celles de l'activité lactogène (MARTAL & DJIANE,
1977, P_{14} x). A partir de 125 jours environ, les concentra-
tions sériques d'oCS restent sensiblement constantes pour
chuter quelques jours avant la mise-bas. En raison des très
faibles taux sériques d'hormone de croissance hypophysaire
(MARTAL, 1973, P_5) pendant toute la gestation (MARTAL, 1978,
 P_{18} x), il est aisé de mesurer directement l'oCS maternelle
par son activité somatotrope (Fig 50) qui est 100 à 300 fois
plus élevée que l'OGH maternelle à partir du dernier tiers
de la gestation. Ce rapport d'activités somatotropes sug-
gère aussi une importance métabolique considérable de l'oCS
par rapport à l'OGH maternelle, et à fortiori, comme nous
le verrons plus loin, chez les brebis à gestation multiple
(Chapitre IX). En revanche, les concentrations plasmatiques
de prolactine sont nettement plus élevées (Fig 51) que
celles d'OGH et beaucoup plus variables (KANN & DENAMUR,
1974 ; DJIANE & KANN, 1975). En admettant une correspondance
entre les résultats déterminés par radioimmunologie et ceux
obtenus par dosages radiorécepteurs, il est possible de dé-
duire l'activité lactogène de l'oCS. A 100-120 jours de ges-
tation, l'activité lactogène de l'oCS est 5 à 10 fois plus
élevée que celle de la prolactine (Fig 51).

2 - Diagnostic de gestation par dosage de l'oCS maternelle (MARTAL, non publié)

Les niveaux sériques d'oCS peuvent être utilisés
comme méthode de diagnostic tardif de gestation, en confir-
mation d'un diagnostic précoce par la progestérone. Ces

TABEAU XV

DIAGNOSTIC DE GESTATION
PAR DOSAGE DE L'OGS A 110 JOURS DE GESTATION

	DETERMINATION DE L'ACTIVITE SOMATOTROPE SERIQUE (1)	DETERMINATION DE L'ACTIVITE LACTOGENE SERIQUE (1)
Nombre de brebis testées	376 (2)	376 (2)
Nombre de brebis présümées gestantes	349	348
Nombre de brebis réellement gestantes (3)	354	354
Exactitude du test (% de brebis gestantes détectées)	99%	98%

(1) Dosage par radiorécepteur. Les échantillons de sérums sont pris en double à 2 concentrations (10µet 50µl). Les activités OGH et OPRL ne sont pas déduites.

(2) Brebis sélectionnées comme gestantes à 19 jours par dosage de la progestérone sanguine (précision du test : 94%).

(3) Contrôle à la mise-bas : les brebis à agneaux morts-nés et avortées connues sont comprises dans ce chiffre.

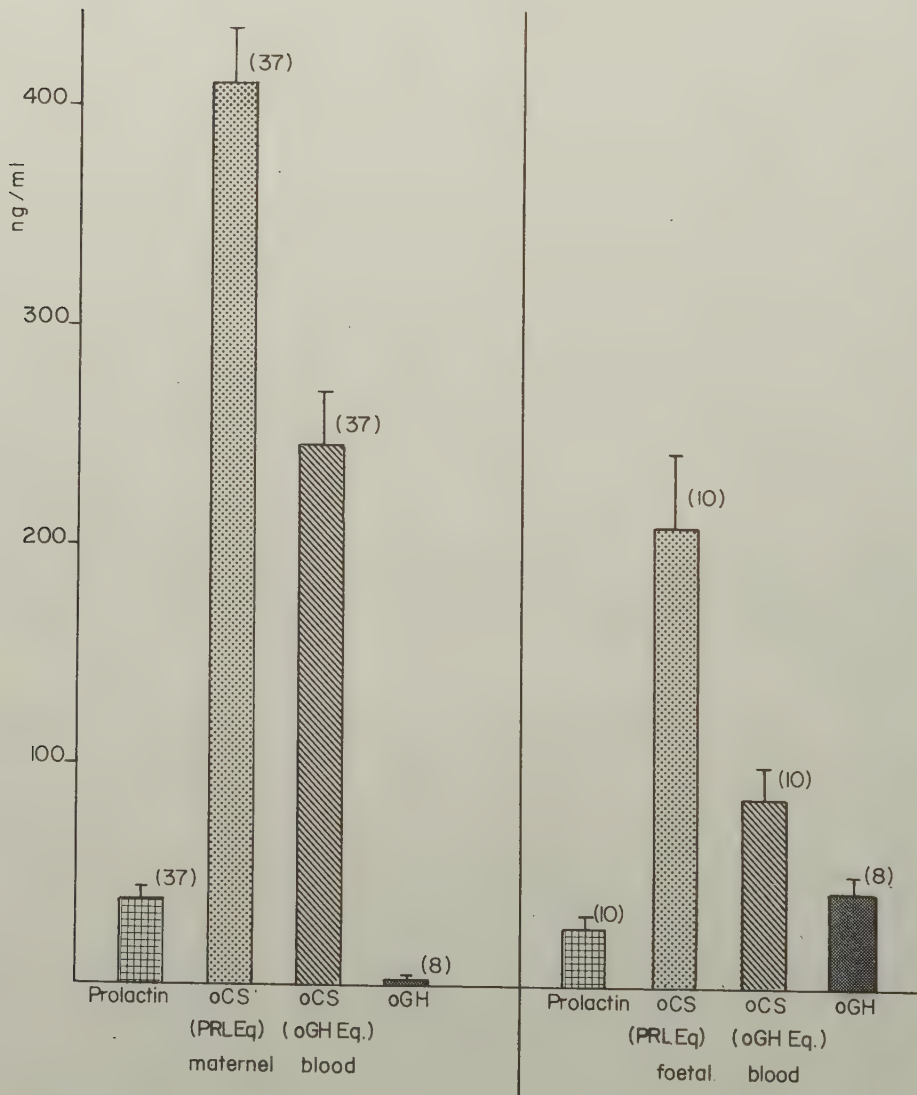
(4) Nombre de diagnostics corrects X 100
Nombre total de diagnostics

concentrations sériques d'oCS ont été déterminées par dosage radiorécepteur sur 376 brebis à partir du 110ème jour après la saillie (Tableau XV). Les brebis réellement gestantes ont été contrôlées à la mise-bas, les brebis à agneaux morts-nés et les brebis dont l'avortement était connu ont été incluses dans ce nombre. Nous avons trouvé par dosage de l'activité somatotrope 349 brebis présumées gestantes sur 354 effectivement gestantes et par dosage de l'activité lactogène sérique 348 sur 354. Le nombre d'erreurs de diagnostic ne s'élève donc qu'à 5 par une méthode et à 6 par l'autre. Ces erreurs de diagnostic par défaut peuvent provenir d'animaux qui ont avorté entre le 110ème jour de gestation et la mise-bas et dont on n'a pas retrouvé les foetus. Elles peuvent également provenir de quelques brebis dont la sécrétion d'oCS est encore insuffisante pour être dosée à ce stade de gestation (110 jours) car certains animaux présentent parfois des taux sériques d'oCS particulièrement bas.

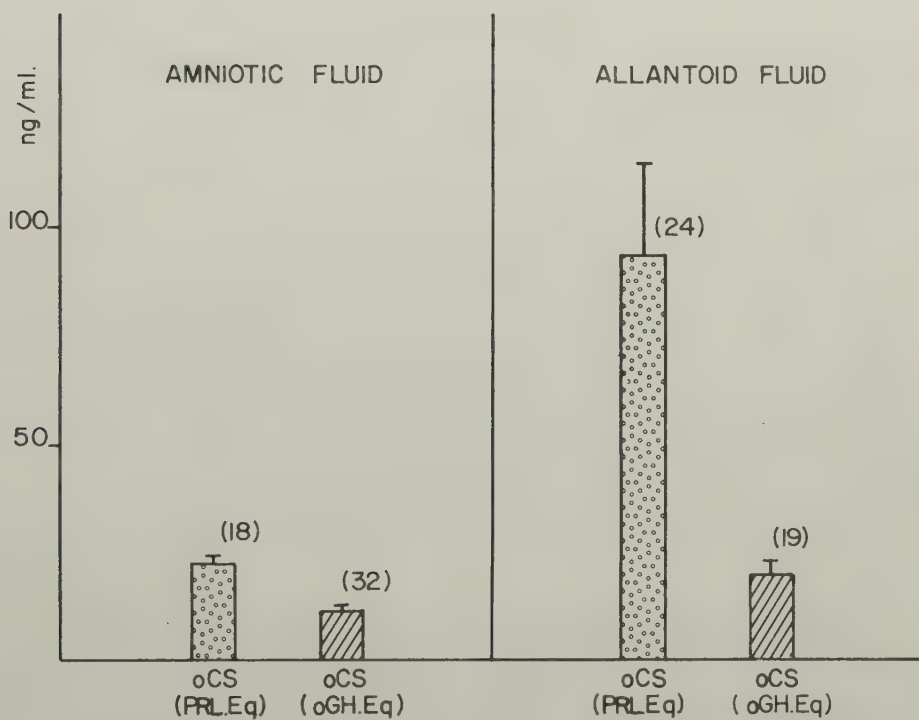
L'exactitude d'un tel test de diagnostic de gestation est toutefois excellente : 99 % et 98 % pour les dosages de l'activité somatotrope et de l'activité lactogène, respectivement.

La méthode par dosage radiorécepteur de l'activité lactogène de l'oCS est théoriquement plus aléatoire car elle risque de prendre en compte des stimulations de la prolactinémie lors de stress importants au cours des prélèvements de sang. En fait, durant cette expérience, il n'en a rien été, ce qui est à priori assez étonnant, vu le nombre important d'animaux manipulés. De toute façon, la méthode du dosage de l'activité somatotrope reste rigoureuse. L'inconvénient d'un tel test est évidemment son usage tardif. Si on applique ce test vers 90 jours de gestation, la précision diminuera considérablement en raison de la variabilité de la sécrétion d'oCS chez les animaux. D'après la Fig 50 le test pourrait être utilisé dès 80 jours, à condition de ne prendre en compte que l'activité somatotrope,

Comparison between serum lactogenic and growth hormone activities, in sheep, from day 100 — 120 of pregnancy.

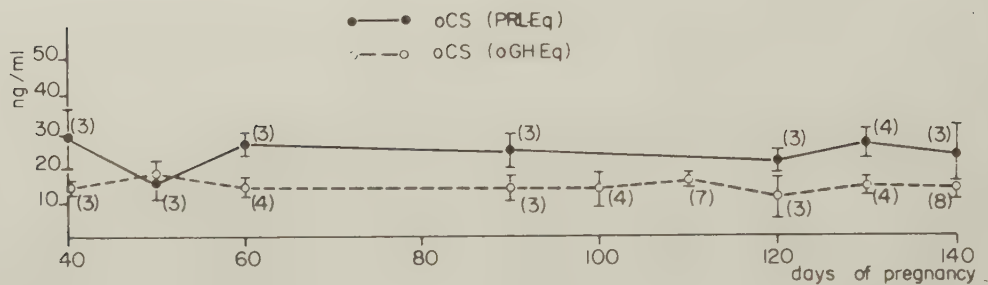


Comparison of CS concentration
in amniotic and allantoic fluids in sheep.



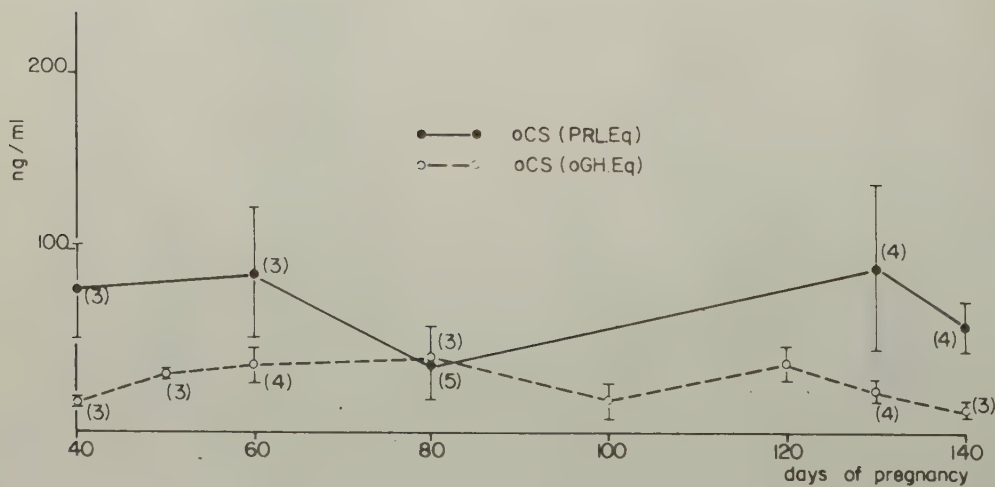
54

Changes in oCS concentration in amniotic fluid during sheep pregnancy



55

Changes in oCS concentration in allantoic fluid during sheep pregnancy



ou d'utiliser des anticorps antiprolactine pour épuiser la prolactine hypophysaire des sérums (SMITH & DJIANE, 1979, communication personnelle). Un dosage radioimmunologique de l'oCS permettrait évidemment de gagner de la sensibilité et de la spécificité mais nous ne l'avons pas encore mis au point.

3 - Comparaison des concentrations des activités lactogène et somatotrope de l'oCS chez la mère, chez le fœtus et dans les liquides amniotique et allantoïdien.

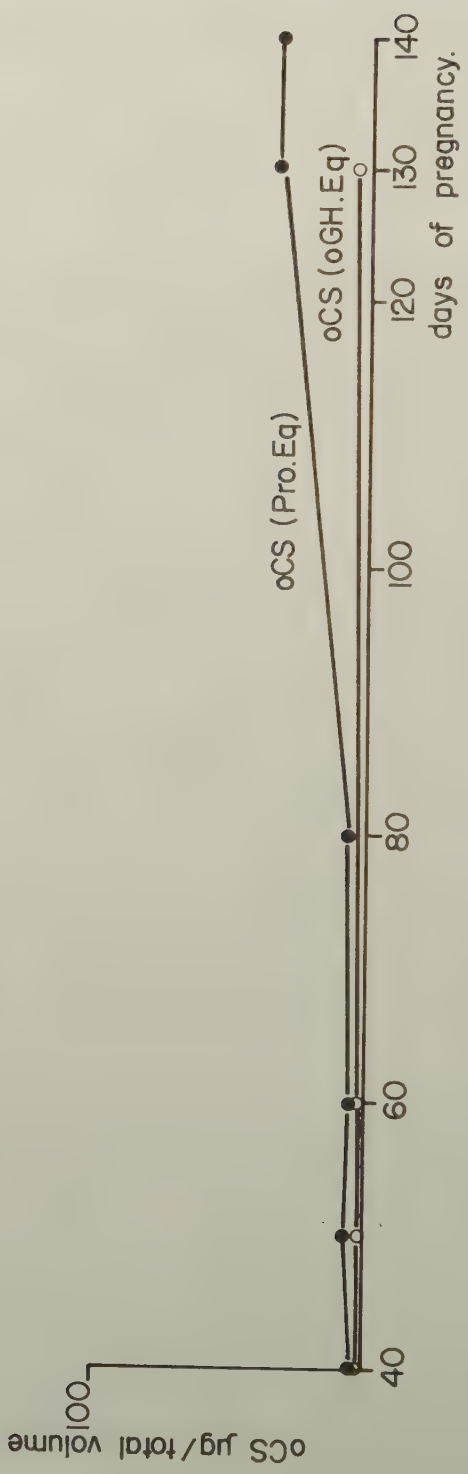
A 110-120 jours de gestation, l'activité lactogène de l'oCS est sensiblement double de l'activité somatotrope dans le sang fœtal comme dans le sang maternel (Fig 52). Nous avons développé plus haut l'étude des variations des taux sériques de l'oCS comparées à celles de l'oGH et de la prolactine maternelle. Nous détaillerons l'analyse des activités somatotropes de l'oCS fœtale à propos de la croissance fœtale (Chapitre VIII). Les variations de l'oGH et de la prolactine fœtales y seront également examinées. Comme chez la mère (Fig 50) le rapport de l'activité somatotrope à l'activité lactogène sérique varie seulement de 1/3 à 2/3 chez le fœtus (MARTAL & DJIANE, 1977, P₁₄ x ; MARTAL, 1978, P₁₇ x). Le rapport fœto-maternel des concentrations sériques d'oCS est par contre très variable. Il est de l'ordre de 10 à 80 jours, de 2,2 à 90 jours, de 0,8 à 100 jours, de 0,3 à 120 jours et de 0,2 à terme (MARTAL & DJIANE, 1977, P₁₄ x, Fig 74 ; MARTAL, 1978, P₁₇ x, Chapitre VIII).

Dans le liquide amniotique (Fig 53 et 54), la concentration moyenne de l'activité somatotrope est encore égale à environ la moitié de celle de l'activité lactogène, tout au long de la gestation.

Alors que la concentration somatotrope sérique totale, (oCS + oGH) reste constamment aux environs de 200 ng/ml (Chapitre VIII), l'activité somatotrope moyenne (15 ng/ml) du liquide amniotique reste basse tout au long de la gestation. Il en est de même des variations de l'oCS dans le liquide allantoïdien (Fig 55).

56

Growth hormone and lactogenic activities mean amounts
in total allantoic fluid volume during sheep pregnancy.



Exprimée par rapport au volume total de liquide allantoïdien, la quantité totale d'oCS est très faible (Fig 56) : l'activité lactogène maximale s'élève seulement à quelques dizaines de μg en fin de gestation.

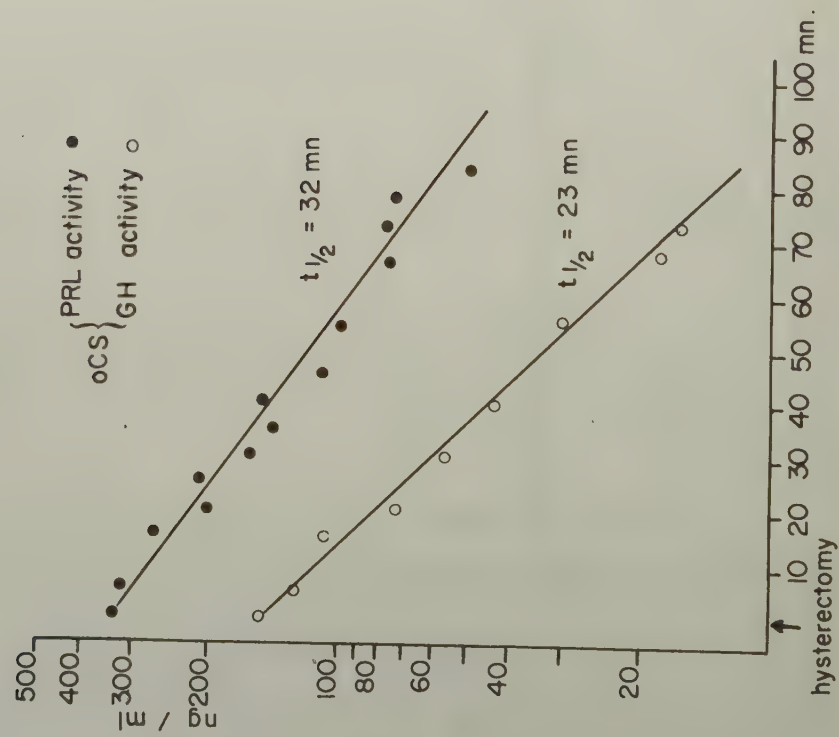
4 - Taux de production de l'oCS (MARTAL, non publié)

Pour connaître le taux de sécrétion de l'oCS chez la mère, le volume plasmatique a été mesuré au Bleu Evans, il correspond à environ 3,5 % du poids du corps. Les Fig 57 et 58 illustrent, à 110 jours de gestation, des vitesses très différentes de disparition sanguine de l'oCS : chez une brebis, la demi-vie de l'activité somatotrope est de 23 mn alors qu'elle est de 40 mn chez l'autre. Au même stade gestatif, la demi-vie de l'activité lactogène de l'oCS est de 32 mn dans un cas et de 60 mn dans l'autre. Quel que soit le stade gestatif (110 ou 140 jours), la demi-vie de l'activité somatotrope est environ égale aux 2/3 de celle de l'activité lactogène et varie selon les animaux, de 20 à 60 mn (Tableau XVI). La différence des demi-vies des deux activités de l'oCS suggère une plus grande labilité de l'activité de croissance. Cette remarque est en accord avec la fragilité de l'activité somatotrope constatée lors des différentes étapes de purification de l'oCS et lors de la radioiodation (Chapitre I et II). Enfin, la constante de turnover par jour des deux activités de l'oCS est respectivement 21 ± 4 ($n = 5$) pour l'activité lactogène et 31 ± 5 ($n = 5$) pour l'activité de croissance. Les taux de production des deux activités ne sont pas significativement différents (Tableau XVI) ce qui est normal puisqu'il s'agit de la même molécule (Chap. III).

Entre le 110ème et le 140ème jour de gestation, le taux de production de l'oCS peut varier d'environ 5 à 35 mg selon les animaux considérés. Au même stade gestatif, il peut varier du simple au triple selon les animaux, en raison de la variabilité du taux de clearance métabolique (MCR) (Tableau XVI). En effet, le MCR varie entre les animaux étudiés, du simple au double et du simple au triple,

57

Ewe 4 282
on day 110 of pregnancy



58

Ewe 4 139
on day 110 of pregnancy

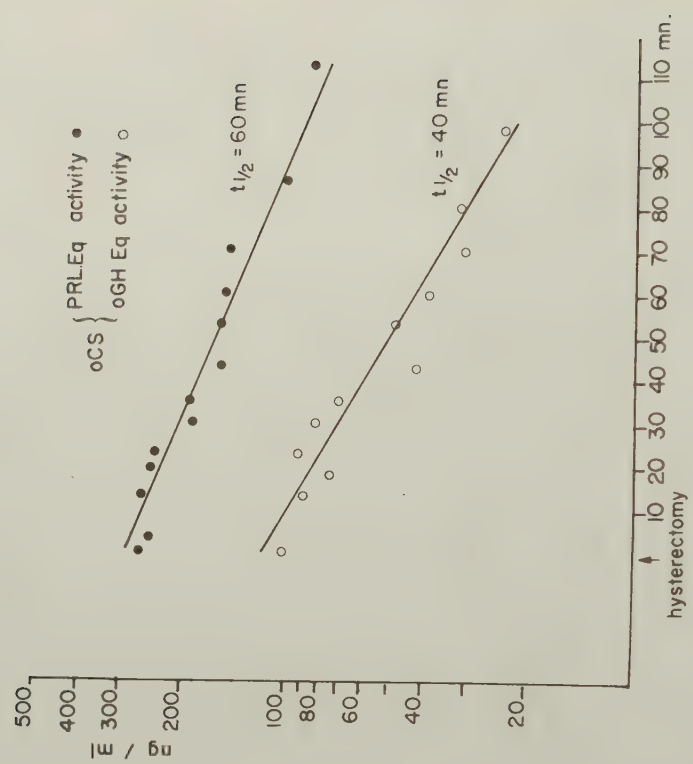


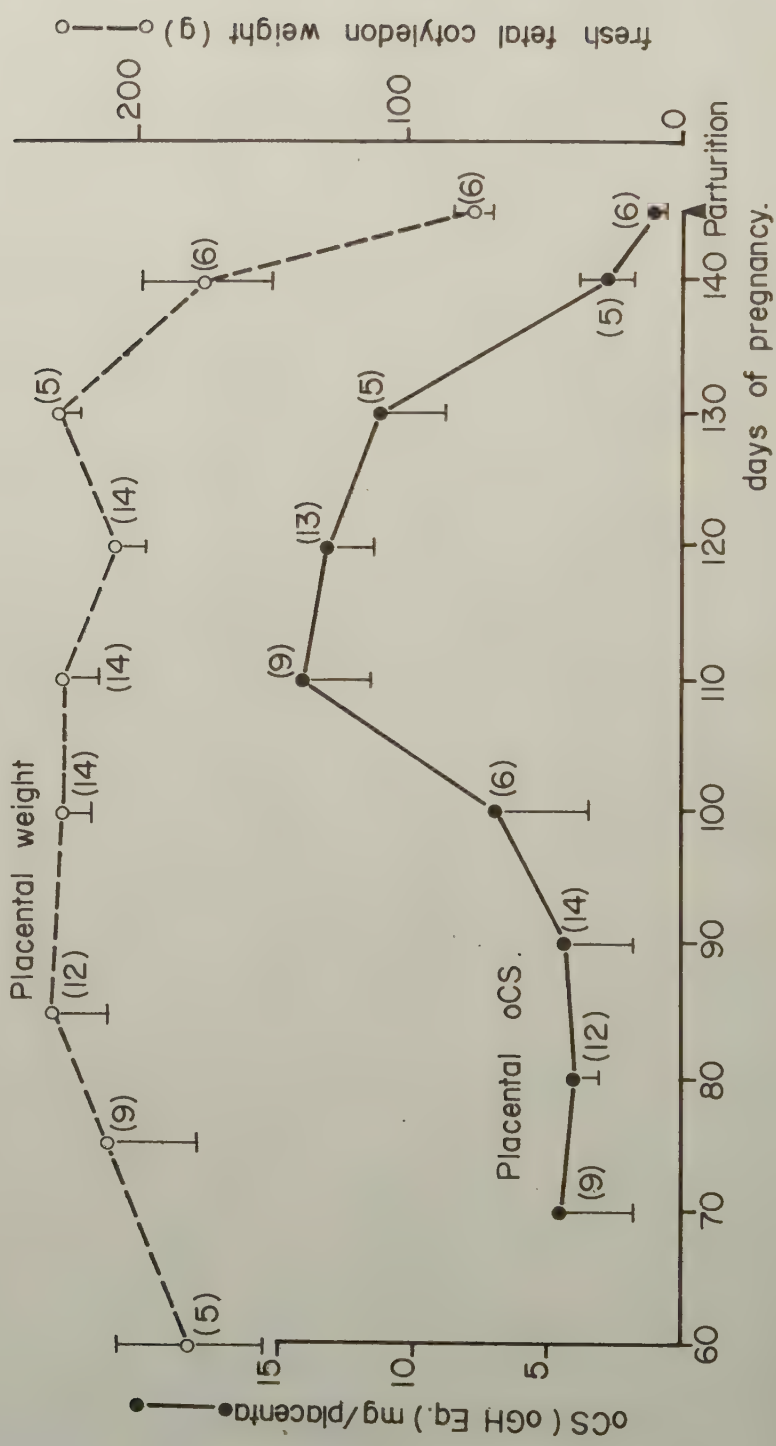
TABLEAU XVI

DEMI-VIE, TAUX DE PRODUCTION ET CLEARANCE METABOLIQUE DE L'ocs

STADE GESTATIF (jours)	NOMBRE DE BREBIS	DEMI-VIE DE L'ocs (mn)			TAUX DE PRODUCTION DE L'ocs (mg/j)		TAUX DE CLEARANCE METABOLIQUE (l/j)		
		$t^{1/2}$ GH	$t^{1/2}$ PRL	$\frac{t^{1/2} \text{ GH}}{t^{1/2} \text{ PRL}}$	T.P. GH	T.P. PRL	MCR GH	MCR PRL	$\frac{\text{MCR GH}}{\text{MCR PRL}}$
110-140	5	37 ± 6	56 ± 11	$0,67 \pm 0,03$	$10,4 \pm 2,2$	16 ± 5	47 ± 8	32 ± 7	$1,52 \pm 0,09$

59

Changes in oCS (oGH Eq.) concentration in the placenta of the sheep during a singleton pregnancy.



(de 16 à 50 litres / jour) à 110 et 140 jours de gestation, respectivement.

L'incubation de sérums enrichis en oCS, en oGH ou en oPRL (pendant 5 h à 39°C) montre que l'activité somatotrope n'est pas plus rapidement dégradée que l'activité lactogène, ce qui suggère que la demi-vie plus courte de l'activité somatotrope de l'oCS ne provient pas d'une sensibilité accrue aux protéases plasmatiques mais plutôt, probablement, d'un catabolisme intense dans le foie et dans les reins. D'ailleurs, chez le fœtus, les reins dégradent davantage l'activité somatotrope que l'activité lactogène puisque le rapport de ces activités est de l'ordre de 1 à 4 dans le liquide allantoïdien et de 1 à 2 dans le sérum sanguin (Fig 52 et 53).

5 - Croissance du placenta et synthèse d'oCS

Au cours de la gestation, nous verrons que l'oCS apparaît très précocément (Chapitre VIII). Elle est détectable dès le 16ème jour de gestation par dosage radiorécepteur dans des extraits de trophoblastes à des taux de 1 μ g par embryon. A 30 jours de gestation, elle atteint 30 μ g par embryon (MARTAL & DJIANE, 1977, P₁₅ x). La cinétique d'apparition de la bCS est comparable à celle de l'oCS, (FLINT, 1979). Le poids des cotylédons fœtaux augmente rapidement jusqu'au 70ème jour de gestation puis reste presque constant jusque vers le 140ème jour (Fig 59).

A la parturition, la masse cotylédonnaire fœtale (74 g $\pm$ 5, n = 6) est seulement environ le tiers de son poids enregistré entre les 80ème et 130ème jour de gestation.

La quantité d'oCS par gramme de tissu frais de cotylédon fœtal augmente jusqu'au 100ème jour pour atteindre un maximum à 110-130 jours et chuter ensuite (Tableau XVII). Un résultat similaire est obtenu quand la concentration de l'oCS est exprimée en mg d'activité somatotrope par placenta, (Fig 59) (MARTAL & DJIANE, 1977, P₁₅ x). Le rapport de l'activité somatotrope à l'activité lactogène est de l'ordre de 0,8 par gramme de placenta.

Changes in oCS concentration and placental weight in sheep with 1 or 2 fetuses on Day 125 of pregnancy.

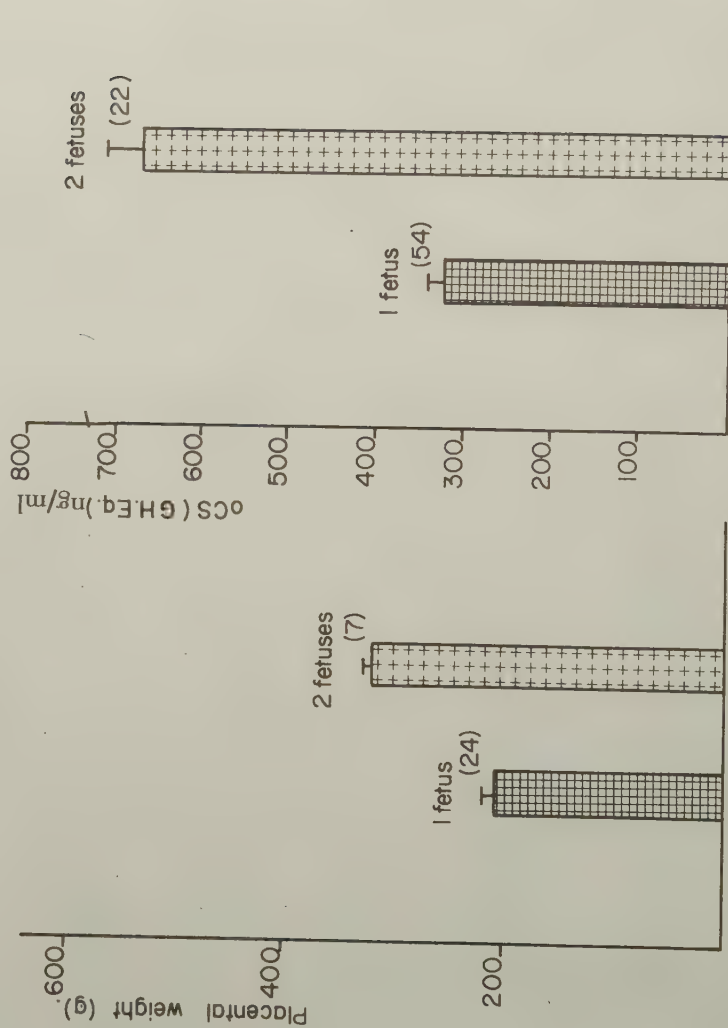


TABLEAU XVII

VARIATION DES CONCENTRATIONS D'OCS PLACENTAIRE

CHEZ LA BREBIS A UN FOETUS

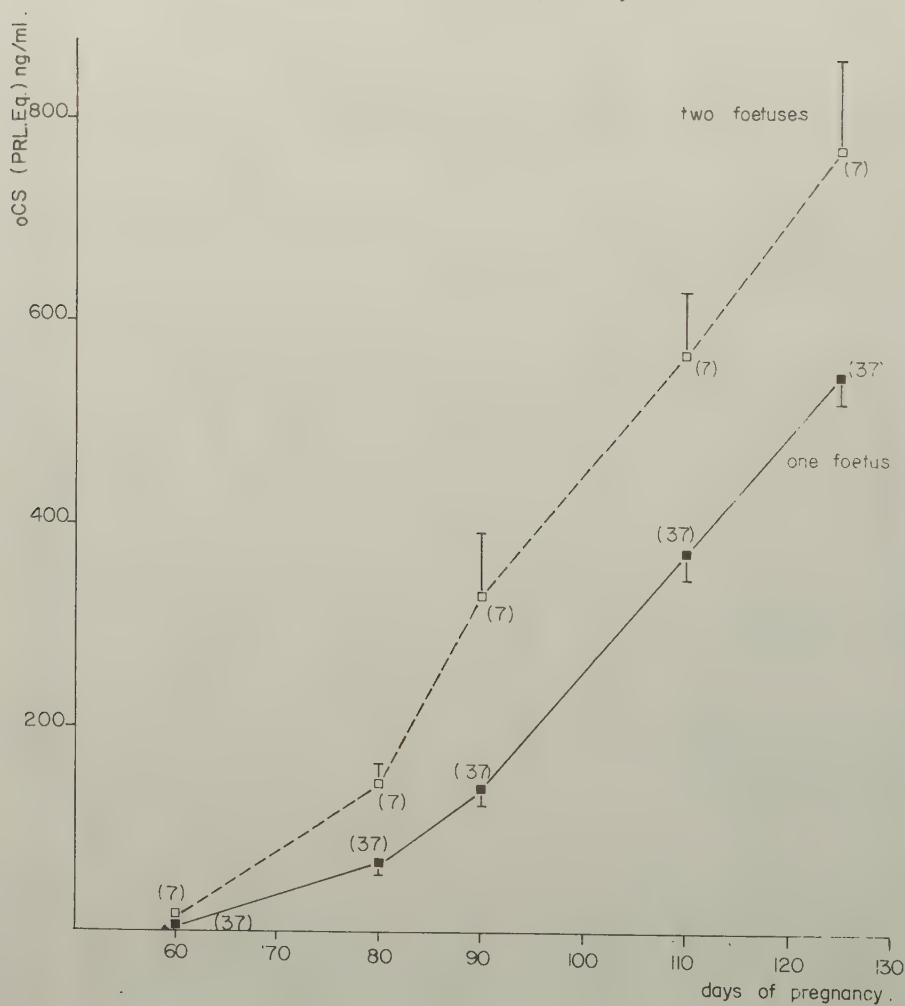
Stade de gestation (jours)	70-75	80-85	90-95	100	110	120	130	140	à terme
Nombre de placentas	9	12	3	6	9	13	5	5	6
Concentrations d'OCS (2) µg/g de tissu frais	22 ± 4 (1)	22 ± 5	20 ± 9	38 ± 7	61 ± 6	62 ± 4	50 ± 9	17 ± 2	10 ± 1

(1) Moyenne ± erreur standard

(2) OCS exprimée en équivalent OPRL (PS7 NIH 24 UI/mg) par gramme de cotylédon foetal

61

Lactogenic activity of oCS
in maternal blood during pregnancy.



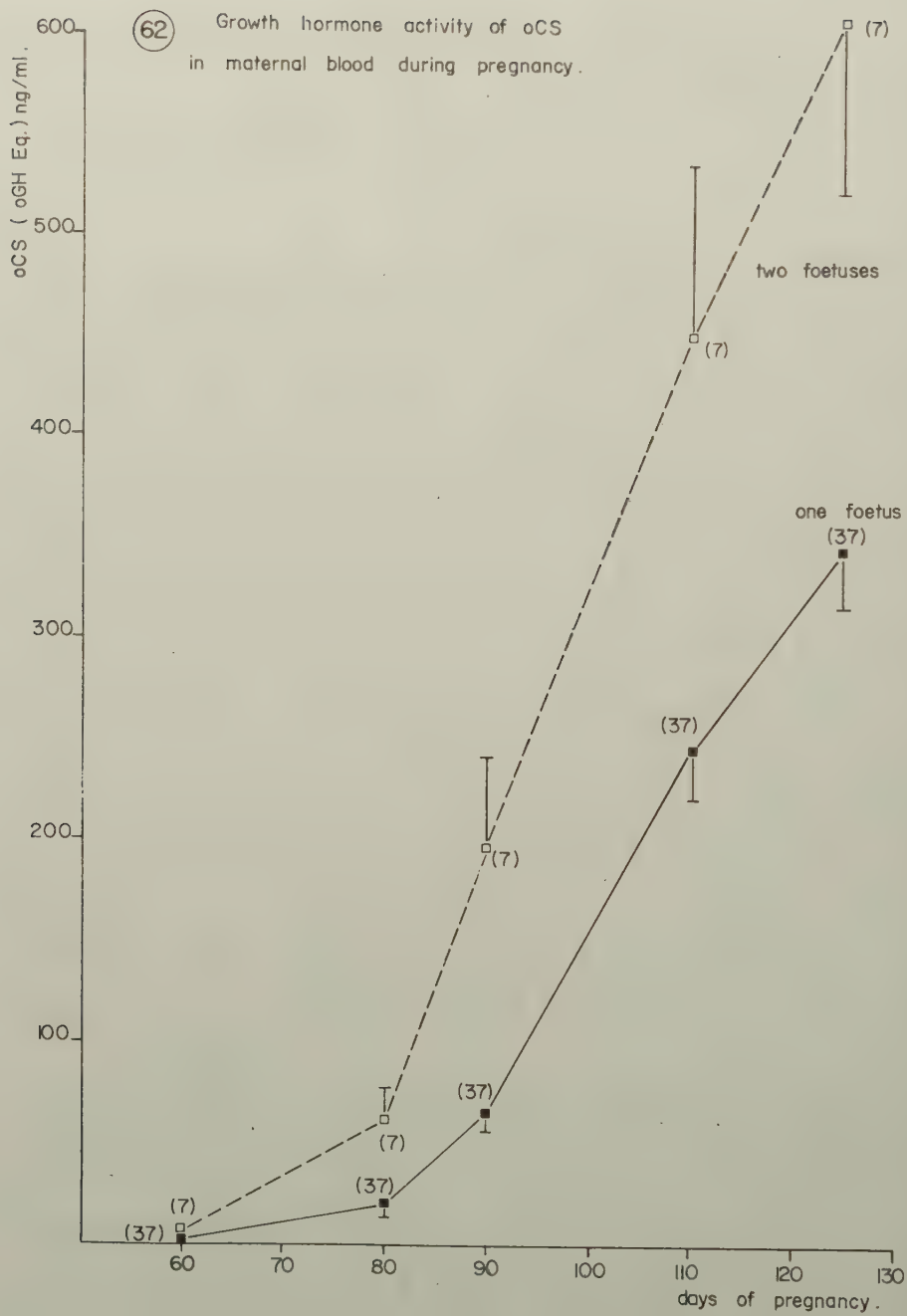
L'évolution de ces deux activités est tout à fait comparable tout au long de la gestation.

La production d'oCS n'apparaît donc pas synchrone de la croissance placentaire (Fig 59).

Après 140 jours, la production d'oCS décroît légèrement plus tôt que le poids du placenta.

6 - Production d'oCS et gémellité

La concentration d'oCS par gramme de tissu placentaire frais est identique quel que soit le nombre de foetus (1,2 ou 3) (MARTAL & DJIANE, 1977, P₁₅ x). Puisque le poids total des placentas est proportionnel au nombre de foetus (Fig 60), la quantité d'oCS par brebis est 2 à 3 fois plus élevée dans les gestations à 2 ou 3 foetus ; une relation identique est observée dans les concentrations sanguines d'oCS (Fig 61). On peut observer tout au long de la gestation cette proportionnalité de l'oCS sérique au nombre de foetus (Fig 61). Ainsi le nombre de foetus de toute brebis gestante peut-il être prévu. Ces diverses corrélations nous ont permis d'analyser trois cas de résorption foetale. Trois brebis présentèrent, en effet, à 120 jours de gestation un foetus et deux corps jaunes alors que même lors d'ovulations multiples, le nombre de corps jaunes gestatifs restants est toujours égal au nombre de foetus. Une brebis présenta un poids placentaire de 318 g (correspondant à une gestation double) et un taux sérique de 562 ng (OPRL éq.)/ml (gestation simple, suggérant que la résorption d'un foetus avait eu lieu. Une autre brebis présenta un poids placentaire de 387g et un taux sérique d'oCS de 1207 ng/ml, indiquant qu'une résorption foetale avait eu lieu au moment où la production d'oCS était à son maximum. La troisième brebis présenta un poids placentaire de 164 g et une concentration sérique d'oCS de 392 ng/ml suggérant que la résorption avait eu lieu à un stade précoce de la gestation, au cours de la croissance du placenta.



Les concentrations sanguines d'oCS et le poids des placentas permettent donc de situer, de façon précise la période de résorption foetale. Les deux premiers exemples démontrent sans ambiguïté l'existence de telles résorptions. Soulignons toutefois que ces cas sont particulièrement rares puisqu'ils ont été les seuls observés sur 146 brebis étudiées (MARTAL & DJIANE, 1977, P₁₅ x).

7 - Diagnostic de gémellité (MARTAL, non publié)

La mise en évidence de la proportionnalité entre les taux sériques d'oCS et le nombre de foetus (Fig 61 et 62), nous a incité à vérifier cette relation sur un grand nombre d'animaux afin de mettre au point une méthode de diagnostic de gémellité (Tableau XVIII). Le nombre global de brebis présumées porter un foetus est de 202 sur 203 brebis réellement à un agneau, et le nombre de brebis présumées porter deux foetus est de 147 sur 146, après dosage par radiorécepteur de l'activité somatotrope de l'oCS. Ces résultats excellents globalement doivent être corrigés d'erreurs d'inversion : certains jumeaux sont pris pour des simples et inversement. Dans ces conditions, l'exactitude du diagnostic de gémellité par la méthode du dosage de l'activité somatotrope est de 90 % pour les brebis à 2 agneaux et de 92 % pour les brebis à un agneau. Aucune brebis n'est dite pleine si elle ne l'est pas, à ce stade de gestation (110 jours) mais nous avons souligné précédemment que la réciproque n'est pas vraie : certaines brebis peuvent être considérées comme vides, alors qu'elles sont pleines, mais le pourcentage de ce type d'erreur n'excède pas 1 %.

Le tableau XVIII montre que le diagnostic de gémellité par détermination de l'activité lactogène de l'oCS est nettement moins bon mais peut occasionnellement confirmer les résultats de la première méthode. Les Fig 61 et 62 montrent qu'il est possible d'avancer la date de ce diagnostic de gémellité.

Nos résultats préliminaires sur un nombre réduit d'animaux (44) (THIMONIER & coll., 1977, P₂₀) sont donc confirmés.

TABLEAU XVIII

DIAGNOSTIC DE GEMELLITE PAR DETERMINATION DE L'OCS

A 110 JOURS DE GESTATION

	DETERMINATION DE L'ACTIVITE SOMATOTROPE SERIQUE (1)	DETERMINATION DE L'ACTIVITE LACTOGENE SERIQUE (1)
Nombre de brebis testées	376 (2)	376 (3)
Nombre de brebis présumées à 1 agneau	202	207
Nombre de brebis réellement à 1 agneau (3)	203	203
Nombre d'inversions (doubles pris pour des simples)	15	22
Exactitude du diagnostic de 1 agneau (4)	92%	87%
Nombre de brebis présumées à 2 agneaux	147	141
Nombre de brebis réellement à 2 agneaux (3)	146	146
Nombre d'inversions (doubles pris pour des simples)	14	18
Exactitude du diagnostic de gestation (4)	90%	84%

(1), (2), (3), (4) : même légende que le tableau XV

VARIATIONS DES CONCENTRATIONS PLACENTAIRES EN OCS

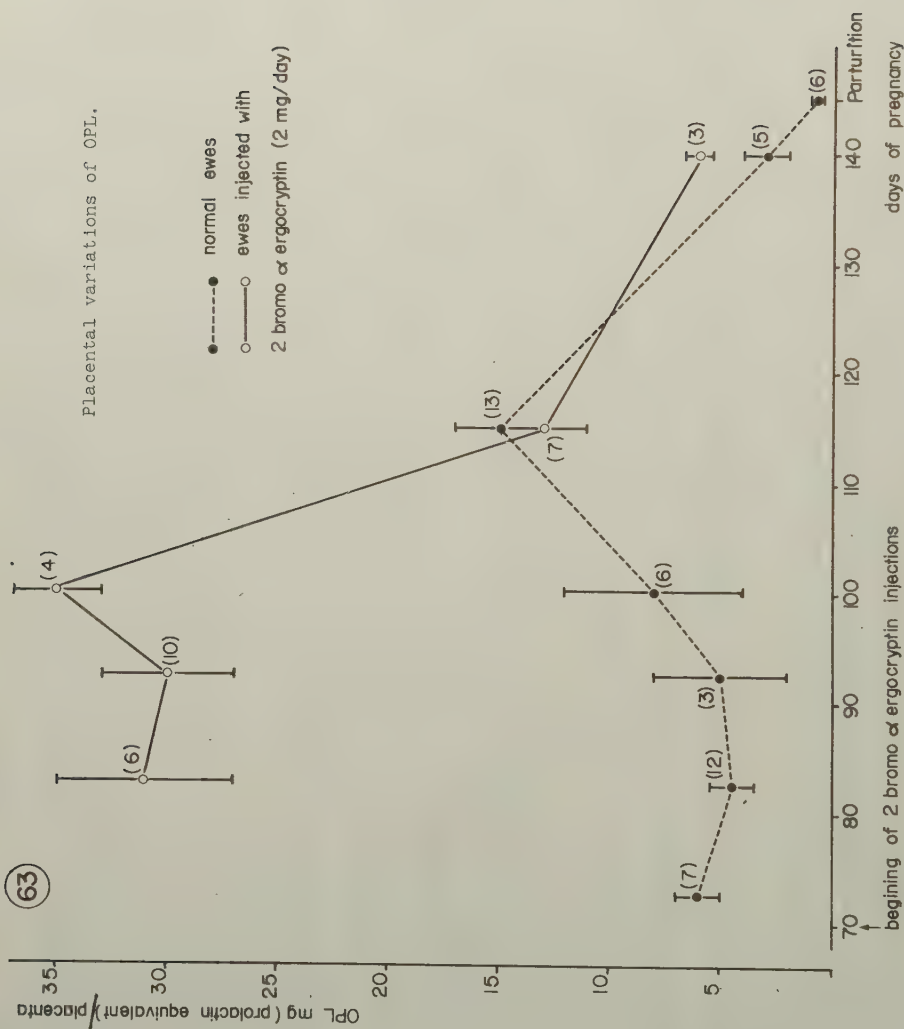
APRES UN TRAITEMENT A LA BROMOCRYPTINE

	CONCENTRATIONS PLACENTAIRES EN OCS ($\mu\text{g/g}$ tissu frais) (1)			
	80-85	90-95	100	110-120
Stade de gestation (jours)				140
Brebis témoins	22 ± 5 (12) (2)	20 ± 9 (3)	38 ± 7 (6)	70 ± 5 (13)
Brebis traitées	136 ± 6 (6)	98 ± 13 (10)	142 ± 15 (4)	22 ± 5 (3)
Signification statistique (3)	$P < 0,001$	$P < 0,01$	$P < 0,001$	NS
				NS

(1) Poids des cotylédons foetaux

(2) oCS exprimée en équivalent prolactine (PS 7 NIH 24 UI/mg), moyenne $\pm$ erreur standard
Le nombre des animaux par groupe est entre parenthèses

(3) Test t de Student pour les moyennes de deux échantillons



Enfin, le diagnostic des brebis à 3 agneaux reste toutefois incertain, parce que certaines brebis à jumeaux sécrètent de très fortes quantités d'oCS et inversement.

8 - Régulation de la sécrétion d'oCS (MARTAL & LACROCIX, 1978, P₁₉ x)

Chez les brebis gestantes hypoprolactinémiques après traitement par la bromocryptine dès le 70ème jour, la concentration placentaire d'oCS est nettement augmentée, alors que les taux sanguins restent inchangés. Elle est d'environ 4 à 6 fois plus élevée entre 80 et 100 jours de gestation, que chez les brebis normales (Fig 63 , Tableau XIX). A cette période, les concentrations d'oCS placentaire des brebis traitées sont maximales. A 110-120 jours de gestation, les témoins non traités atteignent leurs valeurs maximales, ce qui indique que le traitement par la bromocryptine double, d'une part, les valeurs maximales, et avance, d'autre part, d'environ un mois, cette période de concentrations maximales.

Entre 110 et 140 jours de gestation, les taux placentaires d'oCS des animaux traités chutent progressivement pour atteindre les valeurs des témoins (Tableau XIX, Fig 63). Lorsque les concentrations hormonales sont estimées en terme de puissance somatotropique (oGH), au lieu d'activité prolactinique, des résultats identiques sont obtenus, avec un coefficient de correction de 0,8. Ceci ajoute un argument de plus à l'évidence déjà discutée que les deux activités appartiennent à une molécule unique (Chapitre II). Enfin, aucune différence n'a pu être détectée, au cours de leur purification, entre le comportement des fractions actives provenant des animaux témoins et celles provenant des animaux traités.

TABLEAU XX

VARIATIONS DE L'OCS MATERNELLE ET FOETALE
APRES TRAITEMENT PAR LA BROMOCRYPTINE

STADE de GESTATION (jours)	OCS MATERNELLE (1) (ng/ml)			OCS FOETALE (ng/ml)		
	Brebis témoins	Brebis traitées	Signification statistique (2)	Brebis témoins	Brebis traitées	Signification statistique
90 - 95	(3) 159 ± 26 (6)	183±22 (7)	NS	146±17 (6)	131±15 (7)	NS
110 -120	485 ± 54 (7)	461±60 (7)	NS	184±22 (7)	163±16 (7)	NS

(1) oCS est exprimée en équivalent prolactine (PS7 NIH, 24 UI/mg)

(2) test t de Student pour les moyennes de deux échantillons

(3) moyennes ± erreur standard

Nombre d'animaux par groupe entre parenthèses

TABLEAU XXI

VARIATIONS DE LA CONCENTRATION SERIQUE DE PROLACTINE MATERNELLE ET FOETALE
APRES TRAITEMENT PAR LA 2 BROMO-α-ERGOCRYPTINE

STADE de GESTATION (jours)	PROLACTINE MATERNELLE (ng/ml)			PROLACTINE FOETALE (ng/ml)		
	Brebis témoins	Brebis traitées	Signification statistique(1)	Brebis témoins	Brebis traitées	Signification statistique
90 - 95	36 ± 10 (10) (2)	7 ± 3 (7)	P < 0,05	17 ± 6 (10)	14 ± 6 (7)	NS
110 -120	39 ± 7 (10)	3 ± 1 (10)	P < 0,001	35 ± 10 (10)	11 ± 7 (10)	NS

(1) Test t de Student pour les moyennes de deux groupes

(2) Moyenne ± erreur standard. Le nombre d'animaux par groupe est entre parenthèses

A l'inverse des concentrations placentaires, les taux sériques d'OCS des brebis témoins et des brebis traitées par la bromocryptine sont rigoureusement identiques (Tableau XX). Ainsi l'effet puissant de la bromocryptine sur le contenu placentaire en OCS n'est-il pas reflété par les niveaux sériques.

Les différences entre les concentrations de prolactine ovine dans le sérum des animaux témoins et des animaux traités sont hautement significatives à tous les stades gestatifs, ce qui atteste l'efficacité du traitement par la bromocryptine. Par contre, aucune différence n'est observée dans les sérums foetaux (Tableau XXI). Aucune différence n'a non plus été constatée entre le poids des cotylédons des brebis traitées et celui des brebis témoins (Tableau XXII).

TABLEAU XXII

VARIATIONS DU POIDS DU PLACENTA
APRES TRAITEMENT PAR LA BROMOCRYPTINE

POIDS TOTAL des COTYLEDONS FOETAUX (g de tissu frais)	STADE DE GESTATION (jours)				
	80 - 85	90 - 95	100	110 - 120	140
Brebis témoins	⁽¹⁾ 232 ± 20 (12)	247 ± 30 (3)	258 ± 14 (10)	208 ± 20 (13)	181 ± 30 (7)
Brebis traitées	227 ± 30 (6)	208 ± 8 (10)	241 ± 21 (5)	187 ± 14 (12)	193 ± 36 (5)
Signification statistique (2)	NS	NS	NS	NS	NS

(1) Moyenne $\pm$ erreur standard. Le nombre d'animaux par groupe est entre parenthèses

(2) Test t de Student pour les moyennes de deux échantillons.

DISCUSSION

1 - Comparaison des taux d'oCS chez la mère, le fœtus et les liquides amniotique et allantoïdien

Le rapport des activités lactogènes et somato-
tropes de l'oCS que nous avons déterminé dans le sang mater-
nel (MARTAL & DJIANE, 1977, P₁₄ x) est sensiblement iden-
tique à celui donné par KELLY & coll., 1976.

Les valeurs de ces derniers auteurs sont toutefois nette-
ment supérieures aux nôtres (Tableau I).

Il en est de même des valeurs d'oCS déterminées par radio-
immunologie (HANDWERGER & coll., 1977). La principale
raison de cette différence doit provenir de la faible ac-
tivité des hormones standard utilisées par ces auteurs.

Les taux sériques estimés récemment par dosage radioimmuno-
logique en utilisant des hormones standard hautement puri-
fiées et actives sont tout à fait identiques aux nôtres
(CHAN & coll., 1978 ; GLUCKMAN & coll., 1979).

La discordance entre les taux sériques de bCS estimés par
divers auteurs (DJIANE & coll., 1975, C₁₀ x ; KELLY & coll.,
1976 ; BOLANDER & coll., 1976 ; MARTAL, 1978, C₂₂, 1979,
P₂₅ x) relève très probablement de la même explication.

L'évolution des taux sériques maternels d'oCS est identique
chez les divers auteurs (KELLY & coll., 1974 ; DJIANE &
KANN, 1975 ; KELLY & coll., 1976 ; MARTAL & DJIANE, 1977,
P₁₄ x). Par dosage radiorécepteur, l'oCS maternelle est dé-
tectée à partir du 60ème jour de gestation alors qu'elle
est mise en évidence dès le 40-50ème jour par dosage radio-
immunologique (HANDWERGER & coll., 1977 ; CHAN & coll.,
1978).

Bien que les concentrations sériques d'oCS maternelle soient
plus élevées que celle de bCS (environ 50 ng/ml) (DJIANE &
coll., 1975, C₁₀ x ; MARTAL, 1979, P₂₅ x), elles sont très
inférieures (d'un facteur 10) à celles de l'espèce humaine
qui sont elles-mêmes très inférieures à celles du Singe
(d'un facteur 10 également).

Chez les Primates, les taux sériques de cette hormone s'élèvent en effet à environ 5 $\mu\text{g/ml}$ chez la Femme, et à 45 $\mu\text{g/ml}$ chez le Singe, en fin de gestation.

L'oCS foetale sérique a été rarement déterminée par dosage radiorécepteur (MARTAL, 1978, P₁₈ x). Par dosage radioimmunologique (HANDWERGER & coll., 1977, CHAN & coll., 1978 ; GLUCKMAN & coll., 1979), il n'est pas possible de distinguer les deux activités lactogène et somatotrope. Les ordres de grandeur sont toutefois identiques quelle que soit la méthode utilisée.

La détermination du rapport foetomaternel d'oCS sérique par GLUCKMAN & coll., (1979) est également en bon accord avec nos résultats (MARTAL & DJIANE, 1977, P₁₄ x ; MARTAL, 1978, P₁₇ x).

En effet, ce rapport est de 1,2 à 90 jours d'après ces auteurs et chute à 0,14 au moment du terme. Il est donc nettement supérieur à celui de l'espèce humaine qui est de 0,04 au moment du terme (GRUMBACH & coll., 1968).

En ce qui concerne les membranes placentaires, il est intéressant de constater que l'oCS foetale semble traverser en faible quantité la membrane amniotique (MARTAL, 1978, P₁₇ x). Ces résultats sont en accord avec ceux de CHAN & coll., (1978). Nous avons vu que les concentrations d'oCS dans le liquide amniotique restent constantes tout au long de la gestation. Le rapport entre les activités somatotrope et lactogène de l'oCS apparaît analogue dans le liquide amniotique et dans le sang foetal (approximativement 1/2), alors qu'il chute à 1/4 dans le liquide allantoïdien ce qui suggère que l'activité de croissance est davantage détruite dans les reins que l'activité lactogène.

La concentration d'oCS dans le liquide allantoïdien est tout à fait compatible avec la valeur moyenne déterminée par HANDWERGER & coll., (1977) au moment de la délivrance (29 ng/ml).

Dans l'espèce humaine, il est étonnant qu'à de faibles concentrations sanguines d'hCS foetale (KAPLAN & GRUMBACH, 1965 ; SAMAAAN & coll., 1966 ; JOSIMOVITCH, 1971) au moment de l'accouchement correspondent des taux 5 à 10 fois supérieurs d'hCS amniotique (JOSIMOVITCH, 1971 ; BERLE, 1974). Ces résultats suggèrent une plus grande perméabilité de la membrane amniotique dans l'espèce humaine que dans l'espèce ovine.

Une autre différence importante du liquide amniotique existe entre ces deux espèces, comme nous le développerons dans le chapitre suivant : tandis que le liquide amniotique de la Femme contient des quantités énormes de prolactine, celui de la Brebis n'en renferme que des traces. Alors que la prolactine amniotique humaine semble être sécrétée in situ par la membrane amniotique, les traces de prolactine amniotique ovine proviennent très probablement du sang foetal.

Chez les Primates, la prolactine amniotique pourrait diminuer considérablement la diffusion de l'eau en fin de gestation (LEONTIC & TYSON ; LEONTIC & coll., 1979). Par ce mécanisme, les Primates pourraient réduire la grande perméabilité de leur amnios afin que le foetus grandissant reste bien protégé par un liquide amniotique abondant.

Chez les Ruminants, la moindre perméabilité de la membrane amniotique rendrait ce système de régulation inutile.

L'existence de récepteurs prolactiniques incapables de reconnaître l'hCS et l'hGH, puisque ces hormones n'influencent pas le transport de l'eau tritiée (LEONTIC & TYSON, 1977), mais capables de lier les prolactines humaines et ovines suggère l'existence de sites récepteurs stricts, comme nous l'envisagerons dans le Chapitre X à propos des récepteurs lactogènes mammaires de la Brebis.

Enfin, la capacité osmorégulatrice de la prolactine amniotique humaine peut suggérer une activité identique de l'oCS mais elle n'a pas encore été explorée, à notre connaissance.

2 - Taux de production d'oCS

Nous avons vu que la demi-vie de l'activité somatotrope de l'oCS déterminée après hystérectomie de brebis à 110 et 140 jours de gestation pourrait varier de 20 à 60 mn quel que soit le stade gestatif. Elle est nettement inférieure à celle de l'activité lactogène (MARTAL & DJIANE, 1977, P₁₄ x). Ces résultats sont en accord avec les résultats préliminaires de KELLY & coll., (1974) qui trouvent une demi-vie de 20 mn pour l'activité lactogène de l'oCS chez deux brebis à 140 jours de gestation. Par dosage radioimmunologique, HANDWERGER & coll., (1977) estiment à environ 30 mn la demi-vie moyenne de l'oCS.

La demi-vie de l'hCS a été estimée, par des méthodes d'injection hormonale ou par dosage après délivrance, inférieure à 30 mn (KAPLAN & GRUMBACH, 1965 ; BECK & coll., 1965 ; GRUMBACH & coll., 1968).

La vitesse de disparition sanguine des hormones lactogènes placentaires est environ 50 fois plus rapide que celle de la gonadotrophine chorionique humaine qui est une glycoprotéine.

La demi-vie des hormones de croissance et des prolactines hypophysaires qui sont des holoprotéines est également du même ordre de grandeur que celle des hormones lactogènes placentaires. Par exemple, la demi-vie de la prolactine ovine est de 20 à 30 mn selon les Brebis (KANN & MARTAL, non publié), après estimation par différentes méthodes (injection d'hormone non marquée et d'hormone radioiodée). En fait, la détermination de la demi-vie d'une hormone est souvent assez difficile car la disparition sanguine de l'hormone relève non d'un phénomène exponentiel simple mais d'exponentielles complexes et la manière de déterminer la droite à partir de points non parfaitement alignés (en représentation semi-logarithmique) est souvent délicate (MORETTI, 1967).

Dans notre cas où l'on enlève l'organe producteur (au lieu d'injecter l'hormone), la disparition de celle-ci est un phénomène exponentiel apparemment plus simple et nous n'avons pas eu de difficultés à tracer la droite qui la représente (Fig 57 et 58).

Puisque la sécrétion d'oCS ne varie pas beaucoup au cours d'une période relativement courte, à la différence de la sécrétion des hormones hypophysaires très influençables par les stress, il est possible de déterminer une concentration moyenne d'oCS afin de calculer le taux de production de l'hormone. Ce taux varie naturellement au cours de la gestation. Dans nos expériences, il augmente, selon les animaux, de 5 à 35 mg d'oCS par jour.

Le taux de production maximale d'oCS doit correspondre aux valeurs maximales obtenues à 140 jours, car une régression placentaire est déjà amorcée dans la plupart des cas à cette date (MARTAL & DJIANE, 1977, P₁₅ x). Il est important de remarquer qu'entre 110 et 140 jours, le taux moyen de production d'oCS (16 ± 5 mg d'équivalent Prolactine) est sensiblement équivalent à la concentration placentaire en oCS pendant cette période (Fig 59).

Il est intéressant de remarquer que le taux moyen ($10,4 \pm 2,2$ mg/j) de production d'activité de croissance de l'oCS chez les animaux considérés est beaucoup plus élevé que le taux de sécrétion de l'hormone de croissance hypophysaire qui est de quelques mg dans la plupart des espèces (PARKER & coll., 1962 ; MACHLIN & coll., 1968 ; THOMSON & coll., 1972 ; ALFORD & coll., 1973 ; HAFS & coll., 1975).

Au cours de la production optimale d'oCS, il est tout à fait comparable au taux de sécrétion de l'hormone de croissance d'un Acromégale (15-17 mg d'hGH/24 h, THOMSON & coll., 1972)

ou à celui de l'hormone de croissance chez la Vache (19-20 mg/24 h, YOUSSEFF & coll., 1969). La production de la prolactine est également très élevée chez la Brebis en lactation (60 mg/24 h, DAVIS & BORGER, 1973). La sécrétion importante d'oCS et notamment son activité somatotrope suggère une participation de cette hormone aux métabolismes maternels et foetaux. Nous examinerons cet aspect dans le chapitre IX.

La production d'oCS est toutefois très inférieure à celle de l'hCS qui est estimée à plusieurs grammes par jour dans la deuxième moitié de la grossesse (BECK & coll., 1965 ; GRUMBACH & coll., 1968 ; SINGER & coll., 1970).

Le taux de clearance métabolique de l'activité de croissance de l'oCS est d'environ 45 litres par 24 heures, ce qui est une fois et demie celui de l'activité lactogène. Cette différence de coefficients d'épuration sanguine traduit probablement une plus grande labilité de l'activité somatotrope au niveau rénal.

Quoique en général constant chez chaque individu, du moins dans l'espèce humaine, le taux de clearance métabolique est ici très variable d'une brebis à l'autre (bien que tous les animaux soient d'un poids équivalent d'environ 50 kg). Par contre, le rapport des taux de clearance des deux activités reste assez stable ($1,52 \pm 0,09$).

La participation du foie peut être considérable dans la clearance métabolique totale d'une hormone. En effet, cet organe est le principal siège de la clearance de l'hormone de croissance humaine puisque la clearance hépatique représente 95 % du MCR total chez l'homme (TAYLOR & coll., 1972). Cette rapide épuration de l'oCS peut s'expliquer par l'abondance des sites récepteurs hépatiques à l'oCS. Rappelons aussi que le tissu adipeux contient beaucoup de récepteurs à l'oCS (CHAN & coll., 1978). Néanmoins, comparée à l'hGH ou à la prolactine ovine, la MCR de l'oCS reste nettement inférieure (d'un facteur 3) (THOMSON & coll., 1972 ; DAVIS & BORGER, 1973).

3 - Diagnostic de gestation

Bien qu'il existe un certain nombre de méthodes de diagnostic de gestation chez la Brebis (ROYAT & TAIN-TURIER, 1976 ; THIMONIER & coll., 1977, P₂₀ ; THIBIER & TERQUI, 1978) aucune méthode n'est entièrement satisfaisante.

Le procédé classique de détection de l'oestrus est une excellente méthode de diagnostic des femelles non gestantes (exactitude de 100 %), mais l'exactitude du diagnostic de brebis gestantes est nettement moins bonne (62,5 %), (SAUMANDE & THIMONIER, 1972). Cette méthode n'est pas toujours utilisable, car des femelles non gravides, après un traitement d'induction d'ovulation suivi d'insémination peuvent ne pas présenter de retours en chaleurs, comme c'est le cas notamment chez les brebis pendant la période d'anoestrus saisonnier. De plus, cette méthode nécessite beaucoup de main d'oeuvre, ce qui est contraire à l'évolution des conditions d'élevage.

Une autre méthode de diagnostic de gestation, très utilisée actuellement, est celle du dosage radioimmunologique de la progestérone plasmatique chez la Brebis. Ce procédé est simple et peut être utilisé précocément. L'exactitude des diagnostics d'absence de gestation est excellente (100 %) alors que celle des diagnostics de brebis présumées gestantes n'est que de 83,5 % (THIMONIER & coll., 1977, P₂₀) et de 94 % dans notre expérience. Cette méthode nécessite des prélèvements de sang pendant une période fixe de deux ou trois jours. Ce procédé est donc très astreignant et exige de connaître avec précision la date de la saillie, ce qui n'est pas toujours le cas. En dehors de cette période (19ème jour après la saillie chez la Brebis), il est impossible de distinguer la sécrétion d'un corps jaune de gestation de celle d'un corps jaune cyclique, ce qui limite considérablement l'utilisation de cette méthode dans les élevages où la saillie est mal contrôlée.

Une autre méthode de diagnostic précoce de gestation est le dosage d'un antigène embryonnaire sécrété dès le 6ème jour après l'insémination, (CERINI & coll., 1976).

Les auteurs ont développé un test immunologique de gestation chez la Brebis qui nécessite seulement quelques gouttes de sang (LAWSON & coll., 1976). Mais le taux d'exactitude de ce test n'est que de 64 %.

Puisque toutes les méthodes de diagnostic précoce de gestation présentent des lacunes, il est utile, pour une conduite rationnelle d'un élevage, de confirmer les résultats par une méthode spécifique de diagnostic de gestation. Une méthode relativement tardive de diagnostic de gravidité permet aussi de reconnaître les brebis non gestantes à la suite de mortalité embryonnaire due à une infection (chlamydyose, brucellose...), une intoxication (par le chou, par exemple, BRICE & JARDON, 1976) ou même une lactation (THIBIER & TERQUI, 1978). En effet, le pourcentage d'exactitude de diagnostics positifs de gestation par dosage de la progestérone chez des brebis allaitantes est de 74,3 alors que celui de brebis tarries est de 91,4 (THIMONIER & coll., 1975). Plusieurs procédés de diagnostic de gestation tardif sont utilisés.

La radiographie aux rayons X permet le diagnostic de la gestation entre le 70ème et le 90ème jour de gestation chez la Brebis (WENHAM & ROBINSON, 1972). Le pourcentage de diagnostics corrects dépasse 95 % mais ces résultats exigent un matériel de forte puissance, utilisable à titre expérimental seulement, en raison de son coût et du personnel qualifié nécessaire. Un appareil portable de faible puissance a toutefois été récemment employé (TISSIER & BRELURUT, 1976) mais les résultats sont nettement inférieurs : à 104 jours le diagnostic de gestation est exact seulement dans 92 % des cas.

L'application des ultrasons au diagnostic de gestation a été réalisée par divers auteurs : LINDHÄL (1966, 1968) ; FRASER & ROBERTSON (1968) ; HULET (1969) ; BOSC (1971). Ce diagnostic est peu précoce et d'exactitude variable (THIBIER & TERQUI, 1978). Il dépend notamment du temps passé par animal à rechercher la variation de fréquence de l'onde incidente après réflexion sur les particules en mouvement (effet DOPPLER). A 70 jours de gestation,

l'exactitude du diagnostic de gestation des brebis sûrement vides est de 100 % et des pleines de 73 % (BOSC, 1971). C'est donc surtout une méthode sûre de diagnostic de non-gestation.

La détermination des oestrogènes plasmatiques maternels d'origine placentaire, par dosage radioimmunologique, permet un diagnostic de confirmation entre le 100ème et le 120ème jour de gestation (TERQUI & DELOUIS, 1975 ; THIBIER & TERQUI, 1978). L'exactitude du diagnostic de brebis gestantes est de 99 % alors que celle du diagnostic de brebis non gravides est de 84 % (THIMONIER & coll., 1977, P₂₀).

La détermination de l'hormone lactogène placentaire sérique maternelle par dosage radiorécepteur est un test de gestation tardif mais très spécifique puisqu'à 110 jours l'exactitude du diagnostic de brebis gestante est de 99 % par détermination de l'activité somatotrope et de 98 % par dosage de l'activité prolactinique. L'exactitude du diagnostic de brebis non gravides est de 100 % par les deux méthodes, c'est à dire qu'aucune brebis non gestante n'est estimée gravide, erreur qui peut très bien exister par la méthode de détection de l'oestrus ou par le dosage de la progestéronémie, comme nous l'avons vu précédemment. La détermination de l'oCS sérique correspond aussi à un test légèrement meilleur que le dosage des oestrogènes plasmatiques, méthode habituellement utilisée comme test de confirmation de gestation. Le dosage radiorécepteur est une méthode aussi facile et économique que le dosage radioimmunologique et parfaitement adaptée aux grands effectifs.

D'après la cinétique des activités somatotrope et lactogène, le diagnostic de gestation par dosage de l'oCS est applicable dès le 80-90ème jour (THIMONIER & coll., 1977, P₂₀). En fait, à 90 jours, 90 % des femelles gestantes sont déjà détectées par la détermination de l'activité de croissance de l'oCS. Des résultats analogues et même plus précoces devraient pouvoir être obtenus avec la méthode de dosage radiorécepteur spécifique de l'activité lactogène, en présence d'anticorps antiprolactine (SMITH & DJIANE, 1979, non publié).

Récemment, ROBERTSON & coll., (à paraître) ont réalisé un diagnostic de gestation chez la Brebis par dosage radio-immunologique de l'oCS. Cette méthode permet de réaliser à la fin du 2ème mois de gestation le diagnostic des brebis gravides. Les auteurs reprennent à partir d'un nombre d'animaux plus élevé quoique encore très réduit, les résultats radio-immunologiques de CHAN & coll., (1978). Cette étude a le mérite de transformer en test pratique de diagnostic de gestation des résultats obtenus sur un nombre très limité d'animaux. A la différence des valeurs d'HANDWERGER & coll., (1977) qui utilisent une hormone standard très peu active, les niveaux sériques d'oCS mesurés par radioimmunologie (CHAN & coll., 1978 ; ROBERTSON & coll., à paraître) sont parfaitement compatibles en ng/ml avec ceux déterminés par dosage radiorécepteur.

4 - Diagnostic de gémellité

Il est possible de déterminer par radiographie aux rayons X, avec un appareil portable de faible puissance, le nombre de foetus. A 104 jours, le diagnostic est exact dans 92 % des cas (TISSIER & BRELURUT, 1976). La manipulation est toutefois lente car il faut attacher l'animal. A des stades plus précoces, les diagnostics erronés doivent provenir d'une ossification insuffisante des animaux.

Par dosage de la progestéronémie entre 91 et 105 jours après la saillie, l'exactitude du diagnostic du nombre de foetus est de 92 % pour GADSBY & coll., (1972). Malheureusement quelques femelles gestantes sont trouvées non gravides et inversement.

La détermination du nombre de foetus par le taux d'oestrogènes plasmatiques maternels a été également proposée. (TERQUI & DELOUIS, 1975). Les gestations multiples ne furent détectées que dans 65 % des cas à 110 jours de gestation et dans 50 % à 102 jours (THIMONIER & coll., 1977, P₂₀). Le diagnostic du nombre de foetus par dosage radiorécepteur de l'activité somatotrope de l'oCS est exact dans 92 % des cas pour les brebis à 1 agneau et dans 90 % des cas pour les brebis à 2 ou 3 agneaux (à 110 jours de gestation.)

Les résultats sont nettement moins bons par détermination de l'activité lactogène totale (87 % et 84 % respectivement). Ces derniers pourraient toutefois être améliorés par dosage de la prolactine ou mieux par épuisement au moyen d'anticorps antiprolactine qui ne croisent pas immunologiquement avec l'oCS (Chapitre IV).

La date de ces déterminations peut être encore avancée grâce au dosage radioimmunologique mais une étude similaire n'a encore été réalisée par aucun auteur. Néanmoins par dosage radiorécepteur, il nous a été possible de nettement différencier les brebis à 1 ou 2 agneaux dès 80 jours de gestation (Fig 61 et 62) (THIMONIER & coll., 1977, P₂₀).

5 - Croissance placentaire et production d'oCS

Jusqu'à 80 jours de gestation, une croissance rapide de la masse placentaire est observée avec une faible production d'oCS. Du 80ème au 130ème jour de gestation, le poids du placenta reste constant en accord avec les travaux d'ALEXANDER (1964 a) alors que la synthèse d'oCS s'élève rapidement.

La concentration d'oCS n'est donc pas, tout au long de la gestation, proportionnelle au poids du placenta.

Il est intéressant de noter que dans ce cas comme dans d'autres (glande mammaire de la Brebis, par exemple, DENAMUR, 1965) la sécrétion de l'oCS et la croissance tissulaire ne sont pas synchrones mais alternées. On ne connaît encore rien sur les mécanismes moléculaires de la synthèse d'oCS à la différence des données déjà nombreuses sur l'hCS (BOIME & coll., 1975 ; HUBERT & CEDART, 1975 ; CHATTERJEE & coll., 1976). L'ARN messager de l'hCS a été isolé et traduit. Comme pour de multiples protéines, un précurseur d'hCS (pré-hCS), d'un poids moléculaire de 25000, serait d'abord synthétisé à partir de l'ARNm. La forme hormonale active serait obtenue par clivage enzymatique du précurseur sur la chaîne polypeptidique naissante liée aux polyribosomes (SZCZESNA & BOIME, 1976).

6 - Régression de la masse placentaire et production d'oCS

A partir du 140ème jour de gestation, une décroissance rapide du poids du placenta a lieu jusqu'à la parturition. La chute de la synthèse d'oCS précède légèrement la régression placentaire, ce qui est apparemment normal puisque la cytolyse précède généralement l'histolyse.

Au moment de la parturition, le poids du placenta et la concentration placentaire d'oCS sont très réduits.

Les mécanismes de la régression du placenta ne sont pas encore connus. Il est possible d'impliquer quelques fonctions régulatrices inconnues. L'involution spectaculaire du placenta avant la parturition suggère une activité intense des enzymes lysosomiales notamment car les lysosomes peuvent être labilisés, dans certains cas, sous l'influence des oestrogènes (SZEGO, 1974 ; GUSTAVII, 1975 ; SLOANE, 1977) et la sécrétion des oestrogènes maternels augmente rapidement au moment du terme.

Un rôle des prostaglandines peut aussi être postulé puisque la concentration de $\text{PGF}_2\alpha$ augmente intensément dans les cotylédons maternels avant la mise-bas (LIGGINS & GRIEVES, 1971) et que la $\text{PGF}_2\alpha$ stimule les processus autophagiques dans les cellules lutéales, par exemple. En effet, l'activité de la phosphatase acide, qui est un bon index de l'activité lysosomiale, est notamment très augmentée chez la Brebis après 24 h d'un traitement par la $\text{PGF}_2\alpha$ (Mc CLELLAN & coll., 1977). Mais puisque les lysosomes contiennent une phospholipase A2 (enzyme qui fournit un substrat à la synthèse des prostaglandines) qui est abondamment libérée près du terme, il est possible que l'augmentation de prostaglandine placentaire soit plutôt secondaire à la labilisation initiale des lysosomes par les oestrogènes, ce qui n'empêcherait pas la $\text{PGF}_2\alpha$ d'activer à son tour la labilité lysosomiale (GUSTAVII, 1975).

En réalité, il est probable que l'on assiste, lors de la régression placentaire, à un type de "régulation enzymatique en cascades" qui est devenu maintenant classique en Physiologie, comme c'est le cas dans la coagulation sanguine ou la digestion (NEURATH & WALSH, 1976). Une cascade d'activateurs et d'inhibiteurs de protéases pourraient être impliquée, diverses hormones ne seraient que des régulateurs de ces systèmes protéolytiques. La participation de protéases comme la plasmine peut être suggérée car la synthèse de l'activateur du plasminogène est hormono-dépendante et est impliquée dans de multiples phénomènes physiologiques (histolyse, ovulation, implantation, ostéosarcome, tumeurs mammaires malignes, sarcome de ROUS etc...) et parce que le plasminogène est largement répandu dans l'ensemble des tissus de l'organisme. Une meilleure connaissance des mécanismes de la protéolyse placentaire et de leur régulation aurait probablement son application clinique directe dans les multiples cas de non-délivrance chez la Vache, notamment.

7 - Régulation de la sécrétion d'oCS

En culture de tissus, la sécrétion des hormones lactogènes placentaires, comme celle de la prolactine hypophysaire (NICOLL, 1971), semble être autonome (KAPLAN & GRUMBACH, 1964 ; TALAMANTES, 1975 ; FORSYTH, 1973 ; DJIANE & KANN, 1975 ; SUWA & FRIESEN, 1969, BELLEVILLE & coll., 1973), ce qui ne signifie pourtant pas qu'un contrôle de ces sécrétions ne puisse exister *in vivo*.

Dans nos expériences, l'hypoprolactinémie produite après traitement par la bromocryptine est en accord avec les observations faites chez les Ruminants (SCHAMS & coll., 1972 HART, 1973 ; NISWENDER, 1972 ; KANN & coll., 1977) ainsi que chez beaucoup d'autres espèces (MEITES, 1973).

Mais l'augmentation simultanée d'oCS dans le placenta n'a pas été précédemment observée, à notre connaissance. Bien que le taux de renouvellement de l'hormone placentaire n'ait pas été déterminé, l'augmentation brutale (4 à 6 fois)

de la concentration placentaire d'oCS chez les brebis traitées et le fait que le taux sérique d'hormone circulante n'augmente pas parallèlement, suggèrent fortement une augmentation du taux de synthèse de l'oCS. Le taux de sécrétion peut toutefois être fortement diminué sur des bases relatives, du moins, puisque nous avons montré précédemment (MARTAL & DJIANE, 1977, Px) que dans les conditions normales de gestation, les concentrations placentaires et circulantes d'oCS étaient proportionnelles. D'ailleurs, avec de fortes doses de bromocryptine (5 mg/jour), BUTTLE & coll. (1979) obtiennent chez la Chèvre une diminution des concentrations d'oCS sérique.

L'interprétation de ces résultats reste, toutefois, à l'heure actuelle, largement conjecturale puisqu'aucune action de la bromocryptine sur le placenta n'a encore jamais été mentionnée.

A l'inverse d'autres drogues dérivées de l'ergot, la bromocryptine est dépourvue de tout effet sur la motilité utérine (FLOSS & coll., chez le Lapin) et sur la vasoconstriction (chez le Chat, FLUCKIGER, 1972) mais ceci n'a pas été vérifié, à notre connaissance, chez le Mouton.

Son action inhibitrice sur la sécrétion hypophysaire de prolactine in vivo et in vitro (del POZO & FLUCKIGER, 1973) implique des récepteurs dopaminergiques sur les cellules à prolactine (FUXE & coll., 1977 ; KEBABIAN & CALNE, 1979). Bien qu'on ne sache pas si de tels récepteurs existent sur les cellules binuclées, PAS positive, qui sécrètent l'oCS (DUBOIS & coll., 1976 ; MARTAL & coll., 1977, Chapitre VI) une action directe de la bromocryptine sur ces cellules (pour restreindre la sécrétion d'oCS) est possible.

On peut encore envisager une action inhibitrice de la prolactine sur la sécrétion d'oCS au début de la seconde moitié de la gestation.

On sait que la sécrétion de prolactine est réduite par la prolactine elle-même, comme cela a été démontré à partir de tumeurs à prolactine transplantées (NICOLL, 1971). La biosynthèse et la sécrétion de prolactine sont toutes deux sensibles à l'hCS (NAGASAWA & coll., 1976). Bien que le phénomène inverse n'ait jamais été démontré, il n'est pas impossible que la synthèse de l'oCS puisse être modifiée par le taux de prolactine circulante.

Néanmoins, chez la Chèvre, l'hypophysectomie au 60ème jour de gestation n'affecte pas la sécrétion d'hormone lactogène placentaire caprine (cCS) (BUTTLE & coll., 1979). La concentration placentaire de cCS n'a toutefois pas été déterminée dans cette expérience et nous avons vu qu'elle pouvait être considérablement modifiée. De plus, il est étonnant que chez la Chèvre, une seconde gestation accompagnée d'une lactation (donc caractérisée notamment par une importante sécrétion de prolactine) retarde d'environ un mois la sécrétion d'hormone lactogène placentaire (HAYDEN & coll., 1980, à paraître).

La forte sécrétion de prolactine lors de cette lactation pourrait donc inhiber la sécrétion d'hormone lactogène placentaire alors que la suppression presque complète de prolactine, par la bromocryptine, pourrait favoriser sa synthèse.

Un tel mécanisme devrait impliquer, d'une part, la possibilité pour la prolactine d'atteindre les cellules binucléées, et d'autre part, l'existence de récepteurs à prolactine sur ces cellules. Ces aspects n'ont pas encore été étudiés.

Cependant, un contrôle endocrine de la sécrétion d'oCS est, du moins, suggéré par la migration des cellules binucléées après déconnection hypothalamo-hypophysaire (BASS & coll., 1977, Chapitre VI).

Enfin, on peut souligner que si la prolactine module la biosynthèse de l'oCS, de tels effets semblent être limités à la période comprise entre 70 et 100 jours de gestation puisqu'ils sont absents vers 120 jours alors que la prolactinémie et la biosynthèse de l'oCS atteignent de fortes valeurs.

Néanmoins, un comportement asynchrone des tissus en croissance est fréquent ; comme nous l'avons vu précédemment, la croissance et la capacité sécrétoire du placenta ne coïncident pas et la régulation de ces phénomènes asynchrones reste à découvrir.

CHAPITRE VIII

oCS

et

croissance foetale

Toutes les séquences du développement embryonnaire et foetal (accroissement, multiplication et différenciation cellulaires) sont inscrites dans le programme génétique : "Au cours du développement embryonnaire sont progressivement traduites et exécutées les instructions qui, contenues dans les chromosomes de l'oeuf, déterminent quand et où se forment les milliers d'espèces moléculaires constituant le corps de l'adulte. Tout le plan de croissance, toute la série des opérations à effectuer, l'ordre et le lieu des synthèses, leur coordination, tout cela est inscrit dans le programme génétique" (F. JACOB, 1975).

Mais la différenciation cellulaire suppose une coordination des étapes du développement. Les cellules doivent donc communiquer entre elles soit par contact direct soit par l'intermédiaire d'hormones ou de médiateurs chimiques. On connaît encore très mal la nature des interactions moléculaires intervenant dans les circuits de régulation. Ce réseau de coordination agit probablement au niveau cellulaire par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

Dans ce Chapitre, nous nous limiterons essentiellement à l'étude d'un signal placentaire de la régulation de la croissance foetale : l'oCS. Nous entendrons surtout par croissance foetale, la croissance en longueur du squelette. Mais une croissance normale implique à la fois une augmentation de la taille et du poids. Aussi, pour des raisons expérimentales évidentes, mesurerons-nous la croissance pondérale des foetus.

Nous étudierons tout d'abord les propriétés d'activité de croissance de la somatomammotrophine chorionique ovine, puis, la cinétique de production de l'OCS en relation avec la croissance foetale des agneaux. Nous nous appuierons aussi pour cela sur l'analyse mathématique des courbes de croissance. En raison du rôle direct des somatomédines sur la croissance du cartilage, nous examinerons l'ontogénèse de leur sécrétion ; nous rechercherons également si la prolactine, qui est susceptible d'intervenir dans la régulation des somatomédines, (FRANCIS et HILL, 1975), joue un rôle important dans la croissance foetale chez la Brebis. Nous évoquerons l'influence du milieu sur le développement du fœtus, en étudiant l'incidence d'une lactation induite expérimentalement chez une brebis gestante. Enfin nous discuterons le rôle des nombreux facteurs susceptibles d'intervenir dans le contrôle de la croissance foetale.

MATERIELS ET METHODES

1 - Animaux

- De jeunes Rats Wistar pesant environ 100 g sont hypophysectomisés par la voie transauriculaire. Seuls les rats dont le poids reste constant durant les 15 jours qui suivent l'opération, sont utilisés. Un lot de rats, de même poids, non hypophysectomisés, sert de témoin.

- Des embryons de Poulet, âgés de 11 jours, fournissent les cartilages pelviens nécessaires au dosage biologique de la somatomédine A.

- Des embryons de Mouton sont prélevés, chirurgicalement, à des stades variés de gestation, par lavage des cornes utérines avec du sérum physiologique stérile.

- Des foetus d'Agneau sont recueillis à partir de trois lots de brebis de race Préalpes du Sud sacrifiées à différents stades de gestation.

Lot_I : brebis gestantes normales, servant de témoins.

Lot_II : brebis gestantes traitées deux fois par jour avec 1 mg de bromocryptine à partir du 70e jour de gestation jusqu'à l'abattage des animaux (dans les mêmes conditions qu'au Chapitre VII).

Lot_III : brebis gestantes traitées deux fois par jour avec 25 mg de cortisol injectés par voie intramusculaire à partir du 119e jour de gestation.

2 - Prélèvements

- Les échantillons de sang maternel sont prélevés à la veine jugulaire des brebis une fois par jour dans des tubes dépourvus d'anticoagulants.

- Les échantillons de sang foetal et les liquides amniotiques sont prélevés à l'abattage des animaux. Après centrifugation, les sérums sont stockés à -15°C jusqu'au moment des dosages.

3 - Tests d'activité de croissance

- Traitement_I : Des rats hypophysectomisés reçoivent quotidiennement, pendant plus de trois semaines, 300 μg d'oCS (d'une activité de 0,3 UI/mg exprimée en équivalent bGH N.I.H. déterminée par dosage radiorécepteur). Ces injections sont toujours pratiquées par voie intrapéritonéale dans un volume total de 0,5 ml de sérum physiologique.

- Traitement_II : Des rats hypophysectomisés reçoivent par jour 100 μg de bGH PENTEX (1 UI/mg).

- Traitement_III : Des rats témoins hypophysectomisés reçoivent dans les mêmes conditions 300 μg d'oCS et une quantité d'immunoglobulines de Cheval anti-bGH, suffisante pour neutraliser 200 μg d'oGH.

- Traitement_IV : Des rats hypophysectomisés témoins reçoivent 0,5 ml/j de sérum physiologique.

- Traitement_V : Un dernier lot témoin de rats normaux reçoit aussi 0,5 ml/j de sérum physiologique.

Le gain de poids de tous les animaux est mesuré tous les deux jours pendant toute la durée des traitements (23 jours). A la fin de cette période, les animaux sont sacrifiés, les tibias sont disséqués et l'épaisseur des cartilages de conjugaison mesurée, selon la méthode de PAPKOFF et LI (1962). Les os coupés longitudinalement sont lavés dans l'eau pendant 10 min., puis plongés dans l'acétone pendant environ 6 min. et lavés de nouveau à l'eau pendant quelques minutes. Les moitiés de tibias sont placées ensuite dans une solution de nitrate d'argent à 2 % pendant 2 min. puis rincées à l'eau sous une lumière intensive qui fait brunir les parties calcifiées.

L'épaisseur moyenne des cartilages épiphysaires est ensuite déterminée au microscope à l'aide d'un micromètre.

4 - Tests d'activité somatomédine

Ils ont été réalisés par Jacques CHARRIER (1978) selon la méthode de HALL (1970) modifiée, en séparant au cours de l'incubation la phase de stimulation de celle d'incorporation de sulfate radioactif afin d'éviter la dilution du traceur par des ions sulfates présents en quantité variable dans les échantillons.

- Le milieu d'incubation est du milieu synthétique de HALL dans lequel la sérine et la glutamine sont ajoutées respectivement à 0,35 mM et 0,70 mM. Le pH est élevé à 7,45 avec de la soude et divers antibiotiques sont ajoutés (streptomycine 200 mg/l, pénicilline 200.000 UI/l et amphotéricine B 20 mg/l).

- L'incubation des sérums (dilués à deux concentrations) en présence de cartilages d'embryons de Poulet dure 20 h au bain-Marie à 37°C sous agitation constante.

Les cartilages sont ensuite transférés dans du milieu de Hall sans sérums mais en présence de traceurs radioactifs ($^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ fourni par le Centre Nucléaire d'Amersham, Grande-Bretagne, ou la ^3H -méthylthymidine par le C.E.A.) puis incubés pendant 4 heures. A la fin de cette seconde incubation

les incubats sont portés à l'ébullition. Les cartilages sont conservés toute la nuit en présence de sulfate de sodium saturé, puis rincés pendant 3 h à l'eau ordinaire et dissous individuellement dans 0,25 ml de soluène (PACKARD). La radio-activité est mesurée dans un milieu classique de scintillation (PPO-POPOP-toluène).

- Expression des résultats : Par manque de parallélisme entre échantillons et standards, les incorporations de SO_4^{--} et de thymidine radioactifs en présence de sérums fœtaux sont exprimées en % d'incorporation par rapport au milieu seul. Ce % par rapport aux témoins a pour but de mettre en évidence tous les échantillons inhibiteurs. L'activité somatomédine est calculée en % d'incorporation par rapport à un standard (de même concentration) constitué par un pool de sérums de moutons adultes et estimé à priori égal à 1 Unité par ml. L'activité somatomédine est en réalité la résultante de facteurs stimulateurs et inhibiteurs.

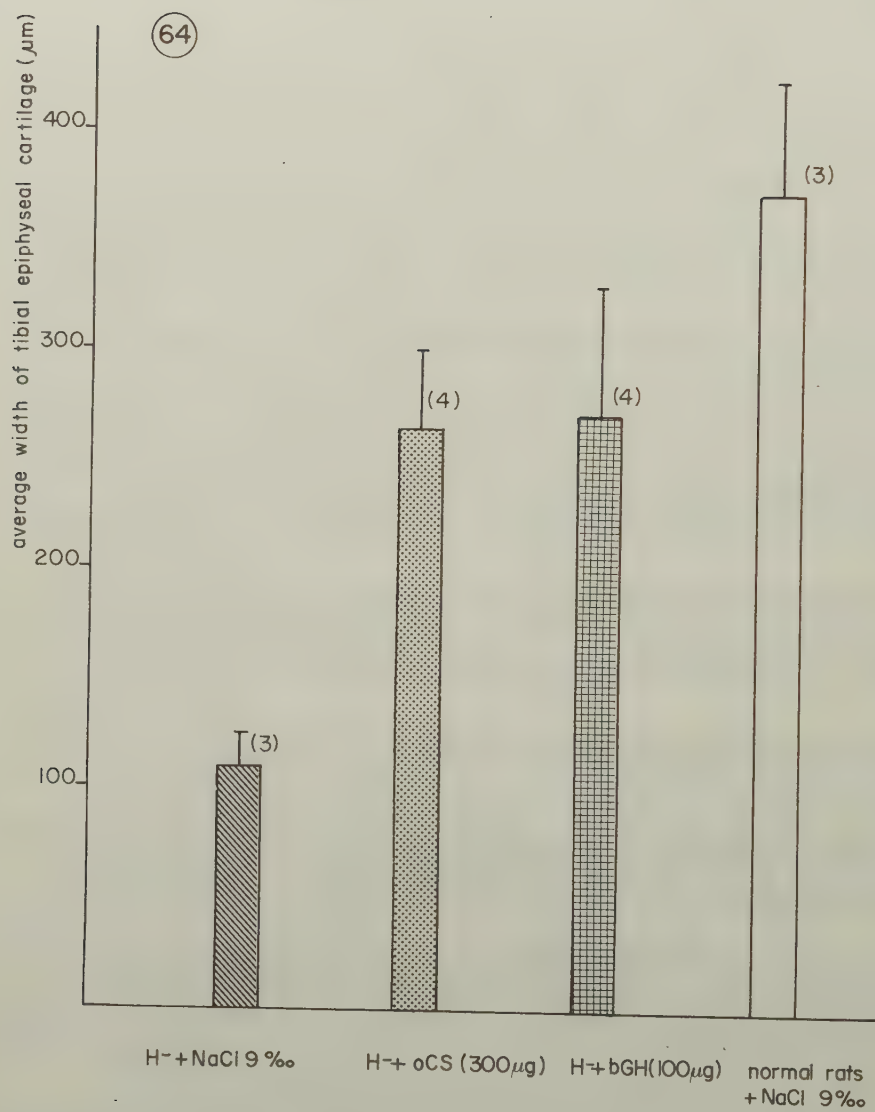
5 - Le dosage radioimmunologique de l'OGH a été réalisé selon la méthode déjà décrite (MARTAL, 1972,1973,P3,P4,P5,Chapitre I)

6 - Le dosage radiorécepteur de l'activité totale de croissance (OCS + OGH) a été réalisé selon la méthode modifiée de TSUSHIMA et FRIESEN (1973) développée dans le Chapitre I.

7 - Le dosage radioimmunologique de la prolactine a été réalisé par G. KANN (1972).

8 - La détermination du volume plasmatique de la Brebis a été réalisée selon la méthode d'HODGETT (1961) au Bleu Evans.

9 - Les analyses mathématiques des courbes de croissance ont été réalisées sur ordinateur au Service de Biométrie de l'INRA par Jean-Pierre VILA.



RESULTATS

1 - Activité de croissance de l'oCS

a) oCS_et_croissance_osseuse

Lorsque l'on injecte quotidiennement à des rats hypophysectomisés une préparation d'oCS, à raison de 300 µg par jour, pendant trois semaines, les cartilages de conjugaison des épiphyses tibiales présentent à l'abattage une épaisseur moyenne d'environ 250 µm alors que celle des animaux témoins hypophysectomisés et traités par une solution de NaCl (9 ‰) est de 100 µm environ (Fig.64). Lorsque des rats hypophysectomisés sont traités dans les conditions précédentes par de l'oCS en présence d'une quantité d'immunsérum anti-OGH capable de neutraliser environ 200 µg d'OGH (afin d'annuler l'effet d'une contamination éventuelle de l'oCS par de l'hormone de croissance foetale), nous obtenons les mêmes résultats qu'avec de l'oCS seule (MARTAL et DJIANE, 1977, P_{14x}).

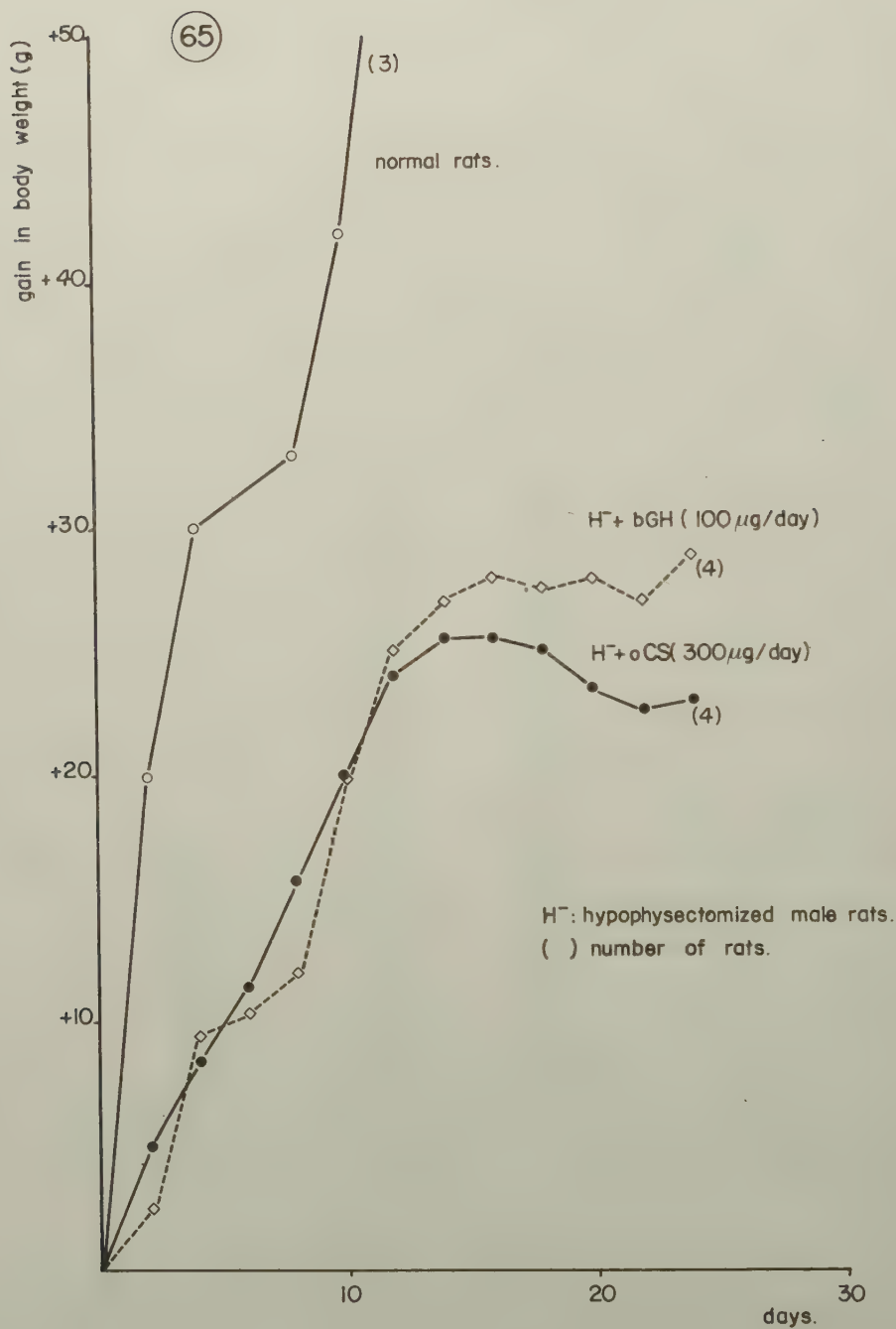
Le traitement d'un autre lot témoin de rats hypophysectomisés, par de l'hormone de croissance bovine (100 µg/j, 1 UI/mg), pendant trois semaines, provoque un accroissement des cartilages de conjugaison des épiphyses tibiales identique à celui des animaux traités par l'oCS (Fig.64).

En revanche, un lot d'animaux témoins normaux présente, au moment de l'abattage, une épaisseur moyenne des cartilages de conjugaison supérieure à 350 µm (Fig.64).

Ces expériences démontrent l'activité de croissance de l'oCS chez le rat hypophysectomisé et suggèrent que l'oCS est capable de stimuler la croissance osseuse du fœtus d'agneau.

b) oCS_et_croissance_pondérale

Au cours des expériences précédentes, le poids des animaux hypophysectomisés traités par l'oCS ou la bGH présente



une phase linéaire d'accroissement (Fig.65). A partir du 12e jour d'injection, une phase en plateau succède à la précédente. Elle résulte très probablement de la formation d'anticorps anti-oCS ou anti-bGH qui neutralisent les effets biologiques de ces hormones. Cette dernière phase est évidemment absente chez les animaux témoins normaux dont la croissance est continue.

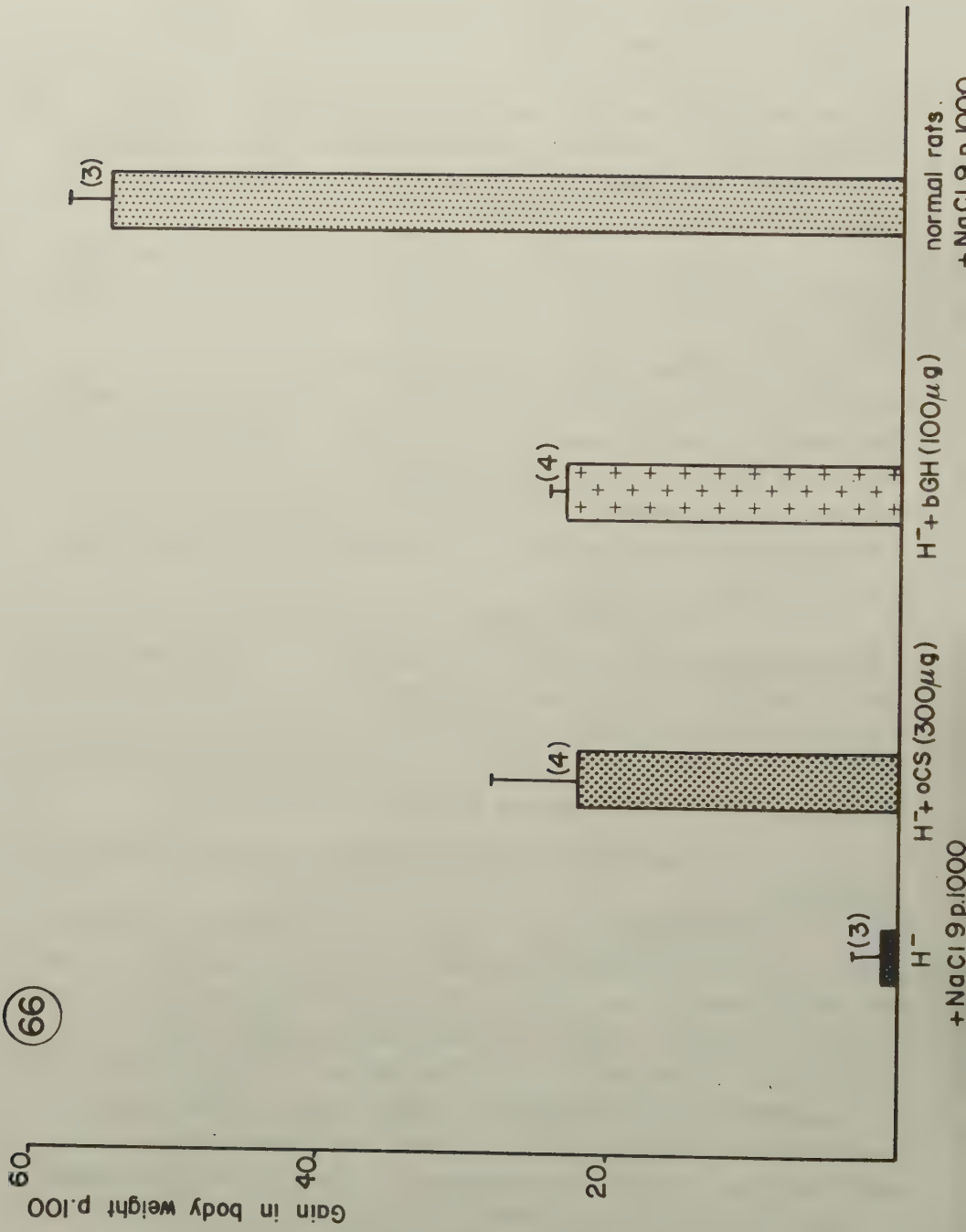
Les gains de poids obtenus par injection de 100 μ g de bGH ou 300 μ g d'oCS sont équivalents (Fig. 65 et 66) (MARTAL, 1978, P_{17x}).

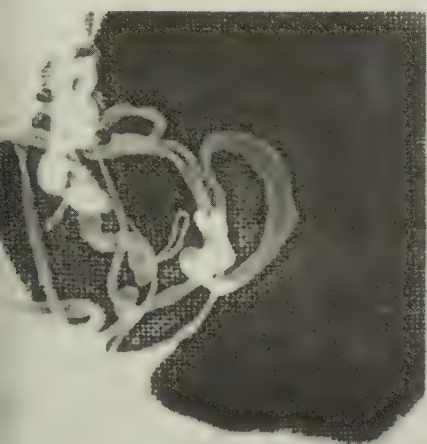
La préparation d'oCS employée est donc trois fois moins active que celle de bGH (PENTEX, 1 UI/mg). Ces résultats sont en accord avec les valeurs de ces préparations déterminées par dosage radiorécepteur. Alors que les animaux témoins hypophysectomisés ne prennent pas de poids (Fig.66), les animaux normaux croissent nettement plus vite que les animaux traités (Fig.66).

Les injections d'immunoglobulines anti-bGH (ou oGH) n'affectant pas l'activité de croissance de l'oCS, cet effet biologique de l'oCS ne peut être imputable à une contamination en oGH de la préparation d'oCS injectée. Cette dernière expérience démontre également l'absence d'une réaction immunologique croisée importante entre l'oCS et l'oGH.

c) Liaison de l'oCS aux récepteurs de l'hormone de croissance

Nous avons vu que l'oCS se lie de manière spécifique aux récepteurs somatotropiques du foie (Chapitre II, caractère bicéphale de l'oCS). Cette propriété est régulièrement mise à profit dans le dosage radiorécepteur de l'activité somatotrope (Chapitre I). La liaison de l'oCS aux récepteurs de l'hormone de croissance des hépatocytes est évidemment essentielle à la croissance puisque les somatomédines sont sécrétées par le foie (Mc CONACHEY et SLEOGE, 1970 ; UTHNE, K et UTHNE, T., 1972 ; SCHIMPF et coll., 1976), et que l'hormone de croissance (VAN DEN BRANDE et VAN BUULS, 1978) et l'oCS (HURLEY et coll., 1977) stimulent la sécrétion hépatique des somatomédines qui agissent directement au niveau des cartilages de conjugaison.

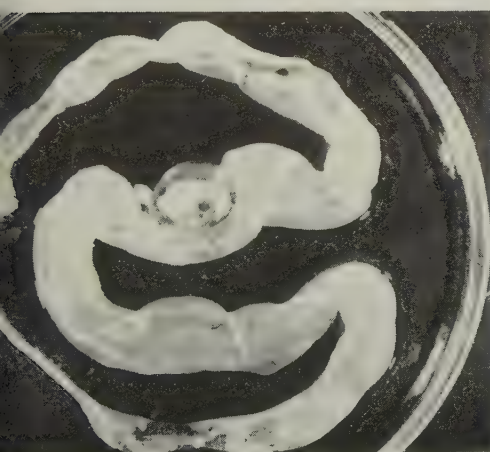




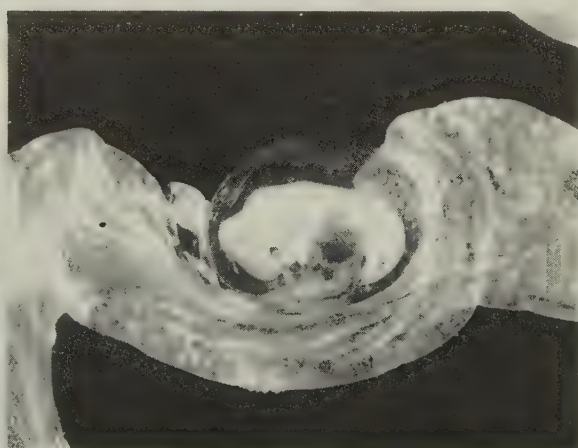
embryon à 14 jours



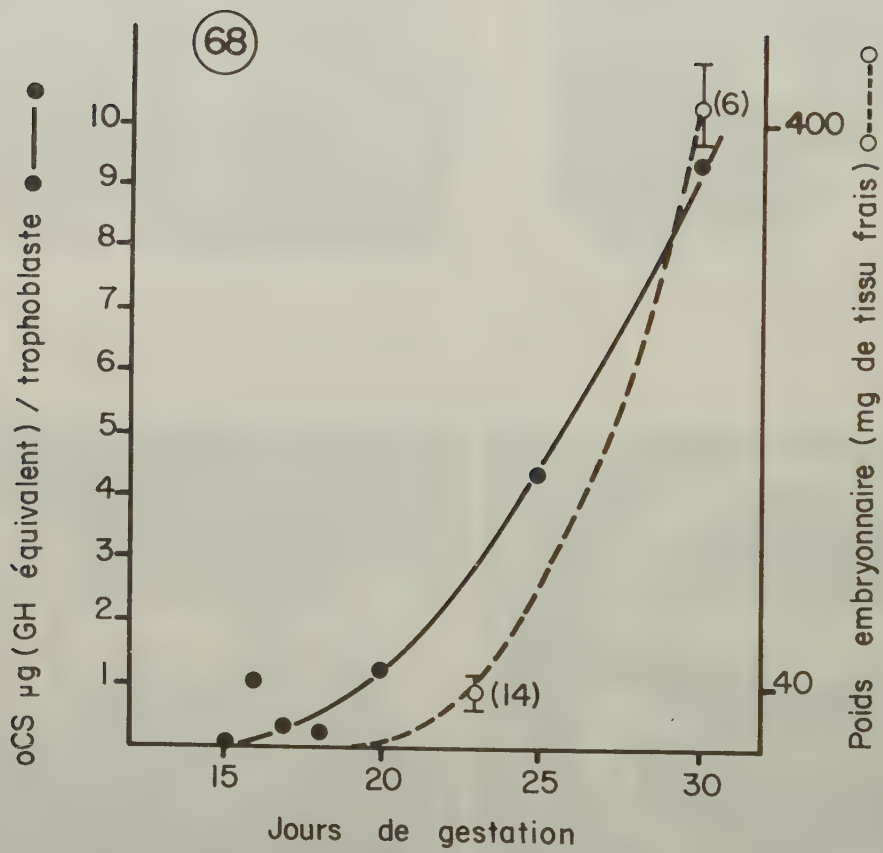
embryon à 14 jours au microscope à balayage (photo G. L'Amet, 1981)
a flèche indique le disque embryonnaire



embryon de 23 jours dans une boîte de Petri
10 cm de diamètre



d) Embryon de 23 jours dans son sac amniotique
(agrandissement de c)



2 - Relation entre la production d'oCS et la croissance foetale

a) Production d'oCS au cours des stades précoces de la croissance foetale chez la Brebis

Le développement embryonnaire est rapide durant le premier mois. Jusqu'au moment de l'implantation (15-16 jours à partir de la fécondation, FLECHON et coll., 1978 ; MARTAL et LACROIX, 1978, P_{21x}) l'oeuf se divise très activement mais l'embryon n'est qu'un bouton cellulaire seulement visible au microscope. Il est entouré, par contre, d'une vaste enveloppe, le trophoblaste (WINTENBERGER-TORRES, 1967). Peu avant la 3e semaine (19-20 jours), l'embryon devient bien organisé et observable directement à l'oeil nu (MARTAL et coll., 1979, P_{24x}).

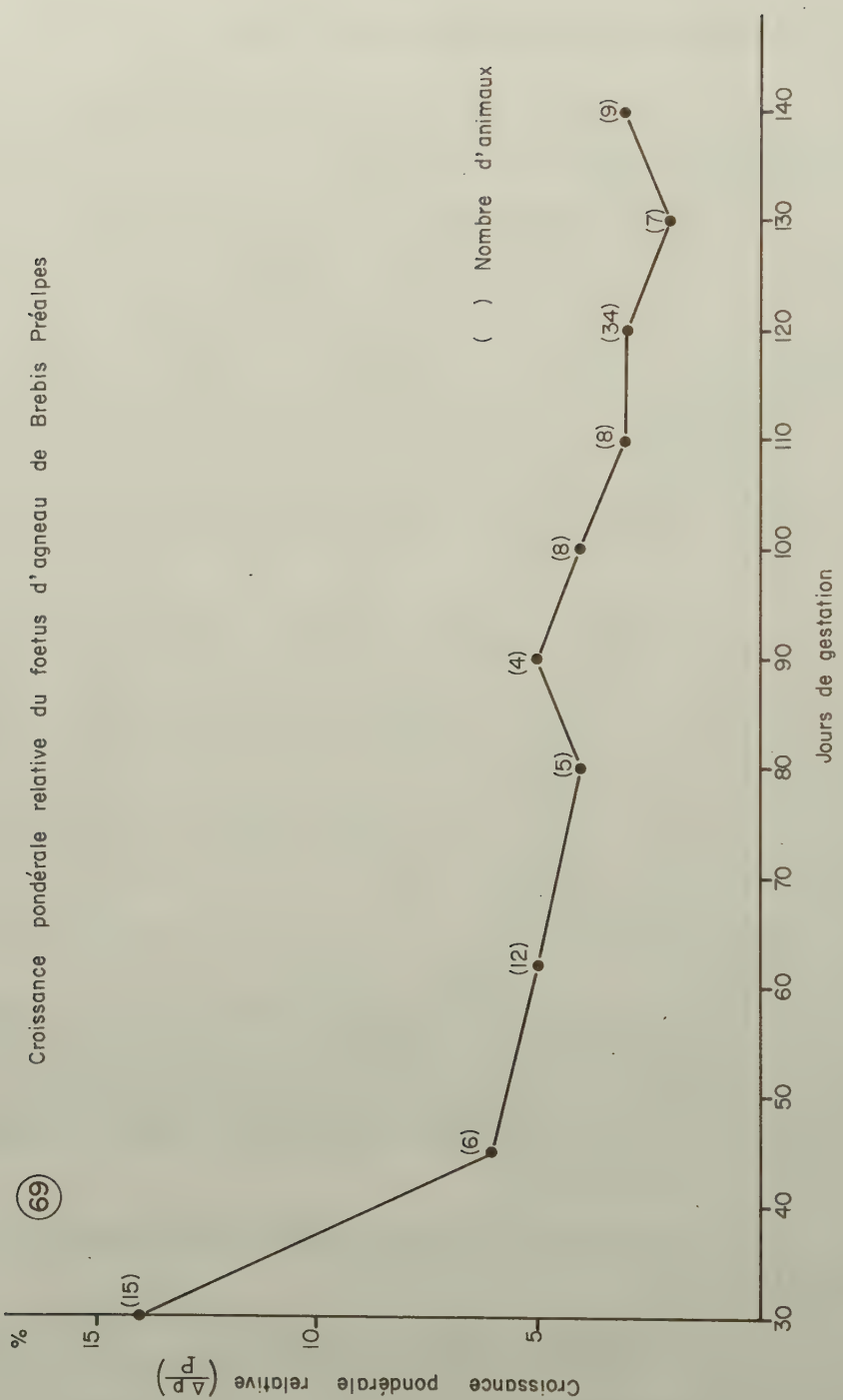
Les figures 67a,b,c,d illustrent l'accroissement spectaculaire obtenu en quelques jours de gestation. A 23 jours, l'embryon de Mouton pèse une quarantaine de mg (39 ± 3 mg, n = 14) et environ dix fois plus à 30 jours (416 ± 34 mg n = 6) (Fig.68).

L'oCS a été mise en évidence dans les extraits de trophoblastes dès le 16e jour de gestation par dosage radio-récepteur (MARTAL et DJIANE, 1977, P_{15x}). Cette apparition très précoce correspond à celle des cellules sécrétrices de l'oCS (Chapitre VI, lieu de synthèse de l'oCS).

La croissance pondérale de l'embryon et la quantité d'oCS par trophoblaste, exprimée en activité de croissance, augmentent d'environ un facteur 10 durant la 4e semaine de gestation (Fig.68), alors qu'il n'existe pas encore d'hormone de croissance hypophysaire.

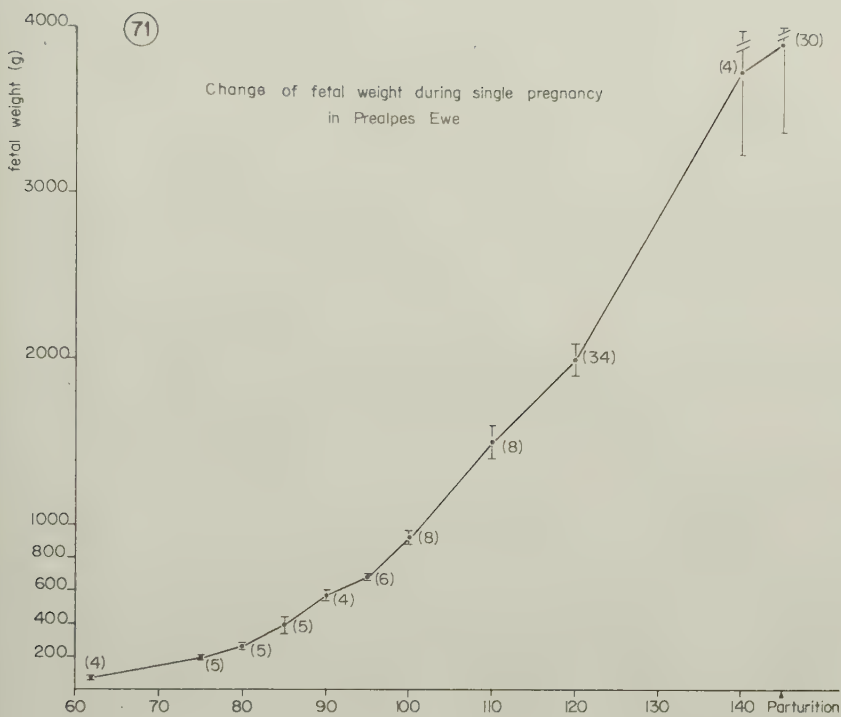
b) Analyse des courbes de croissance pondérale du foetus d'Agneau

La croissance pondérale relative du foetus d'Agneau, c'est-à-dire le rapport : $\frac{\text{gain de poids}}{\text{poids total}} \left(\frac{\Delta p}{p} \right)$ par unité de temps diminue brutalement entre le 30e et le 40e jour de gestation (Fig.69).



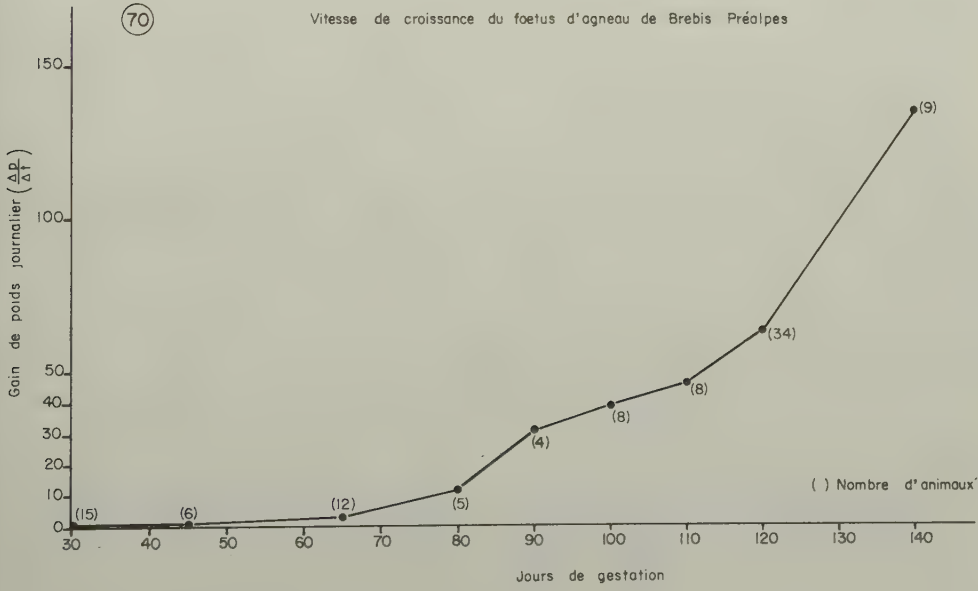
71

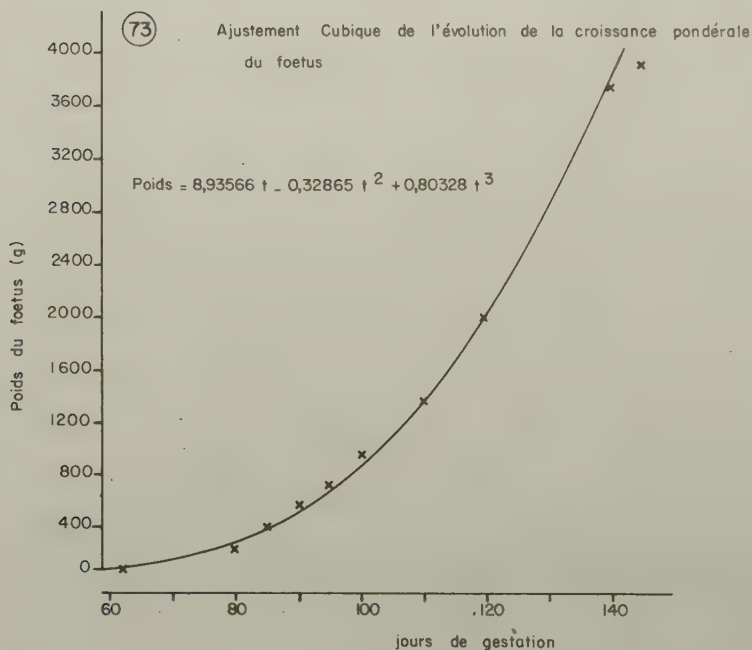
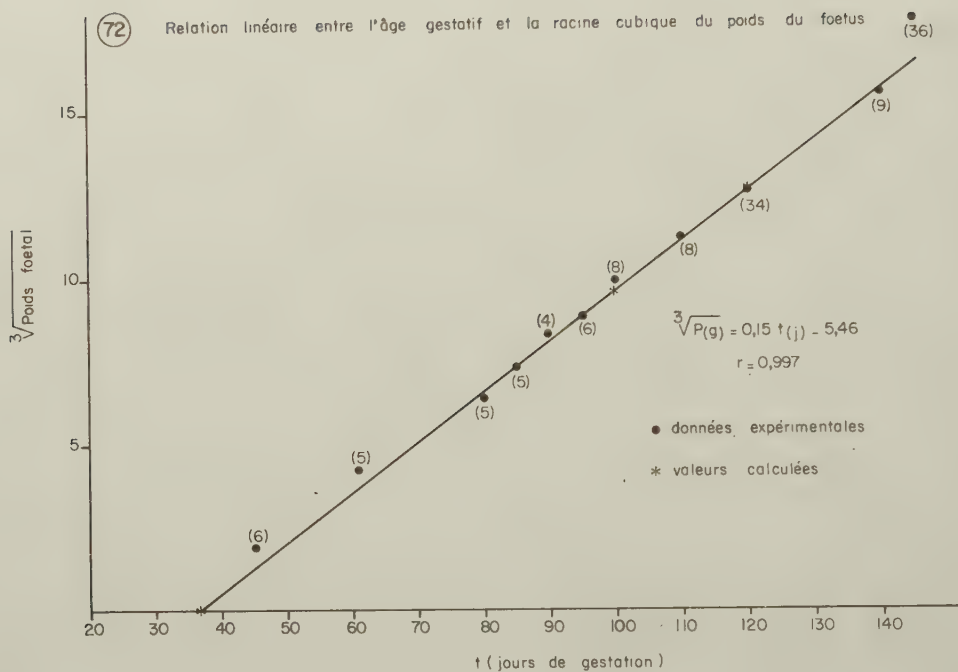
Change of fetal weight during single pregnancy in Prealpes Ewe



70

Vitesse de croissance du fœtus d'agneau de Brebis Préalpes





Par contre, la vitesse de croissance du fœtus d'Agneau c'est-à-dire son gain de poids journalier, ou croissance absolue ($\frac{\Delta P}{\Delta t}$) augmente considérablement au fur et à mesure que l'on s'approche du terme (Fig.70).

A 30 jours de gestation, le gain de poids journalier est d'environ 60 mg alors qu'il est de 135 g à 140 jours.

Il est possible de déterminer avec une grande précision l'âge d'un fœtus d'Agneau en fonction de son poids (Fig.71) grâce à la très forte corrélation entre ces deux paramètres.

Une relation linéaire entre l'âge gestatif et la racine cubique du poids fœtal peut aussi être établie (Fig.72) du 40e jour de gestation à la mise-bas.

$$(\text{Poids})^{\frac{1}{3}} = 0,139 t - 4,449$$

Le coefficient d'ajustement des valeurs expérimentales à la droite de régression est de 0,997.

Cette relation mathématique traduit en fait que la croissance pondérale du fœtus correspond à une croissance linéaire dans chacune de ses trois dimensions spatiales.

L'intersection de la droite avec l'axe des temps se situe à 36,5 jours.

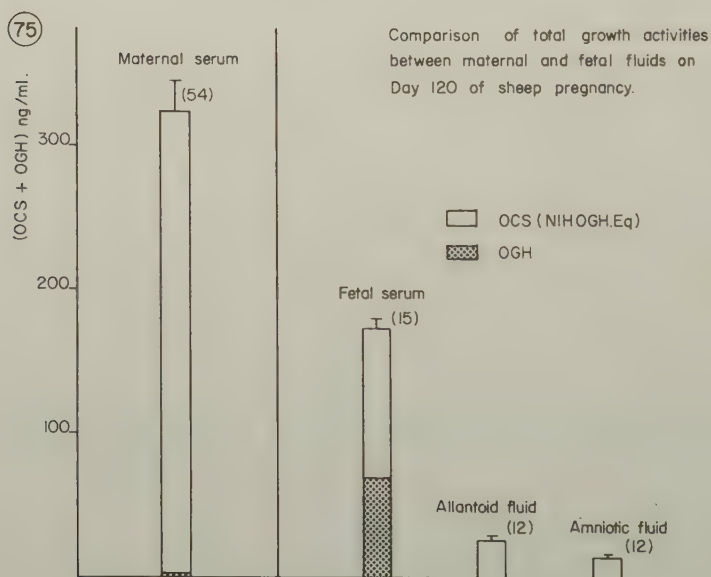
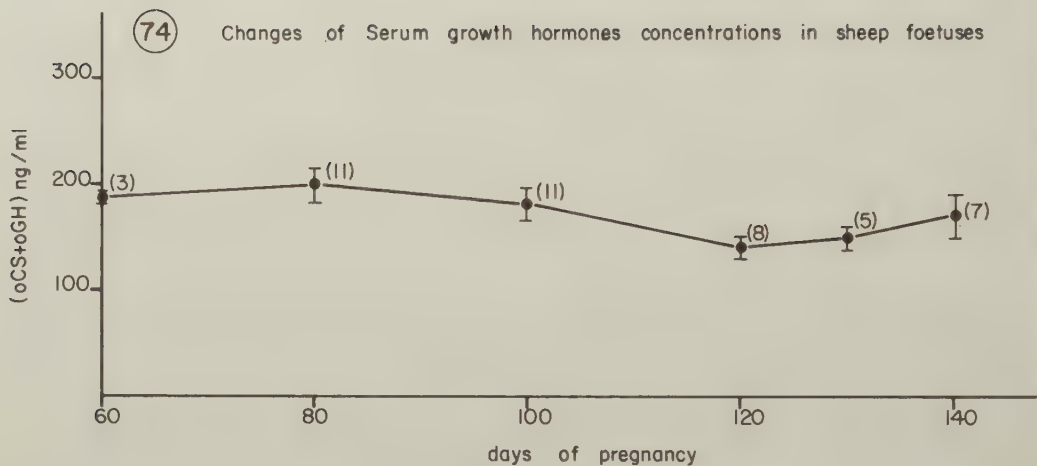
Avant cette période, un accroissement de type exponentiel du poids de l'embryon a été observé (Fig.68).

Plusieurs ajustements mathématiques de la courbe de croissance pondérale des fœtus d'agneaux ont été recherchés. Le meilleur résultat obtenu est l'ajustement des données expérimentales à des polynômes orthogonaux jusqu'au degré 3 (t est le temps de gestation exprimé en jours) (Fig.73).

$$\text{Poids fœtal } P = 8,93566 t - 0,32865 t^2 + 0,00328 t^3$$

Alors que les ajustements linéaire et parabolique sont mauvais, l'ajustement cubique est très bon. Le terme en t^3 est hautement significatif ($P < 0,01$).

Par contre, un terme en t^4 n'apporte pas de précision significative. Cette expression mathématique traduit rigoureusement et sans transformation les résultats expérimentaux observés (Fig.71).



c) Evolution de la concentration d'activité de croissance totale (oCS + oGH) chez le fœtus d'Agneau

La concentration totale d'activité de croissance du sérum fœtal est déterminée par dosage radiorécepteur. Cette somme d'activités de croissance (oCS + oGH) reste presque constante tout au long de la gestation (Fig. 74). Elle est égale à environ 200 ng/ml du 60e au 140e jour. Par contre, les concentrations relatives des deux hormones varient considérablement au cours de la gestation. A 120 jours de gestation, par exemple (Fig. 75), la concentration d'oCS fœtale exprimée en standard oGH (N.I.H.) est sensiblement le double de la concentration d'oGH déterminée par radioimmunologie. Avant ce stade les taux d'oGH sont nettement plus faibles, alors qu'au moment de la mise-bas, les niveaux sériques d'oGH et d'oCS fœtales sont sensiblement équivalents.

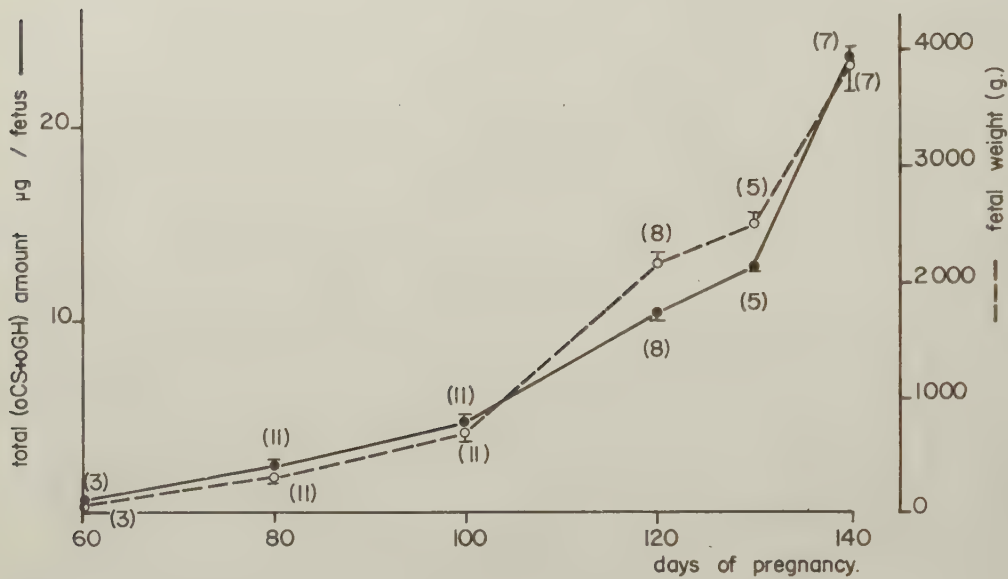
Nos données ponctuelles relatives aux concentrations sériques d'oGH fœtale sont en accord avec l'étude approfondie de BASSETT et coll. (1970). Remarquons enfin que la concentration de l'activité somatotrope due à l'oCS est nettement plus élevée chez la Mère que chez le fœtus : à 120 jours de gestation le taux d'oCS maternelle est environ le triple de celui de l'oCS fœtale (Fig. 75), alors que les concentrations d'oGH sont nettement plus élevées du côté fœtal.

d) Proportionnalité entre le poids fœtal et la quantité totale d'activité de croissance (oCS + oGH) présente par fœtus

Comme dans la plupart des espèces, le volume plasmatique de la Brebis, déterminé à l'aide du Bleu Evans, correspond à environ 3,5 % du poids du corps. Ce résultat est comparable à celui obtenu par d'autres techniques (COGHLAN et coll., 1977). Nous pouvons l'appliquer au calcul du volume plasmatique du fœtus. Par suite, connaissant le poids des fœtus et la concentration sérique en activité de croissance (oCS + oGH), la quantité totale d'activité de croissance par fœtus est déterminée.

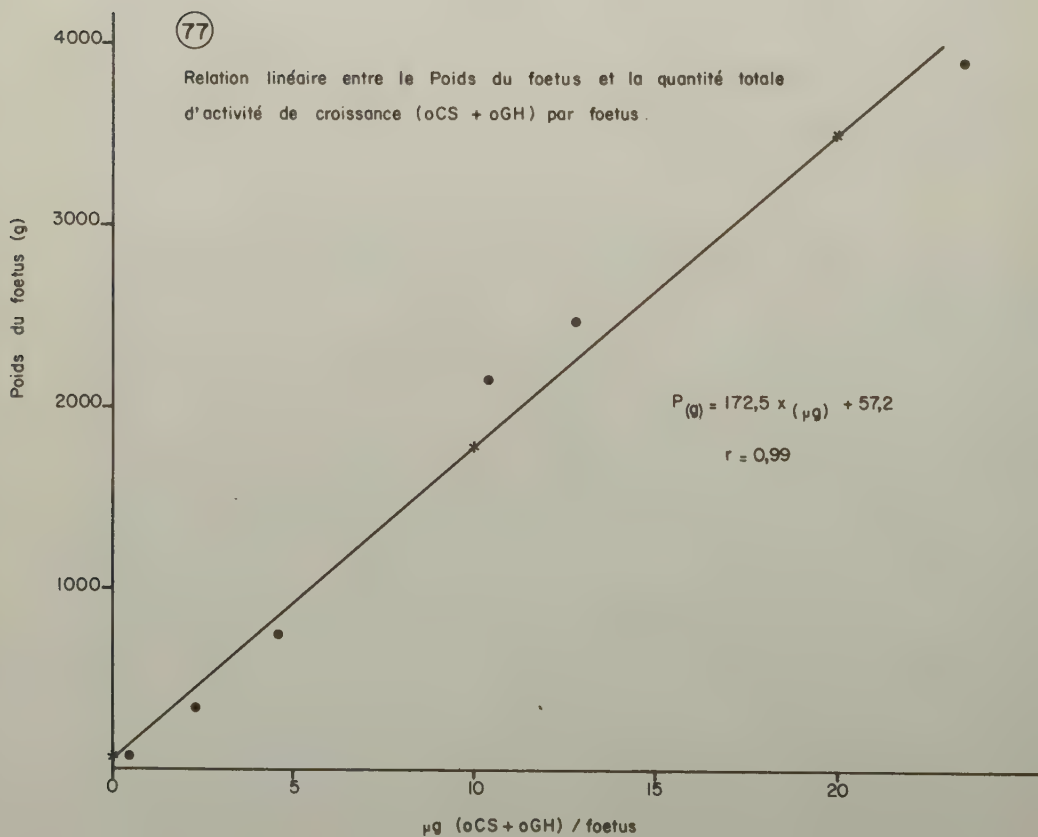
76

Changes of total (oCS + oGH) amounts per fetus
and of fetal weight during sheep pregnancy.

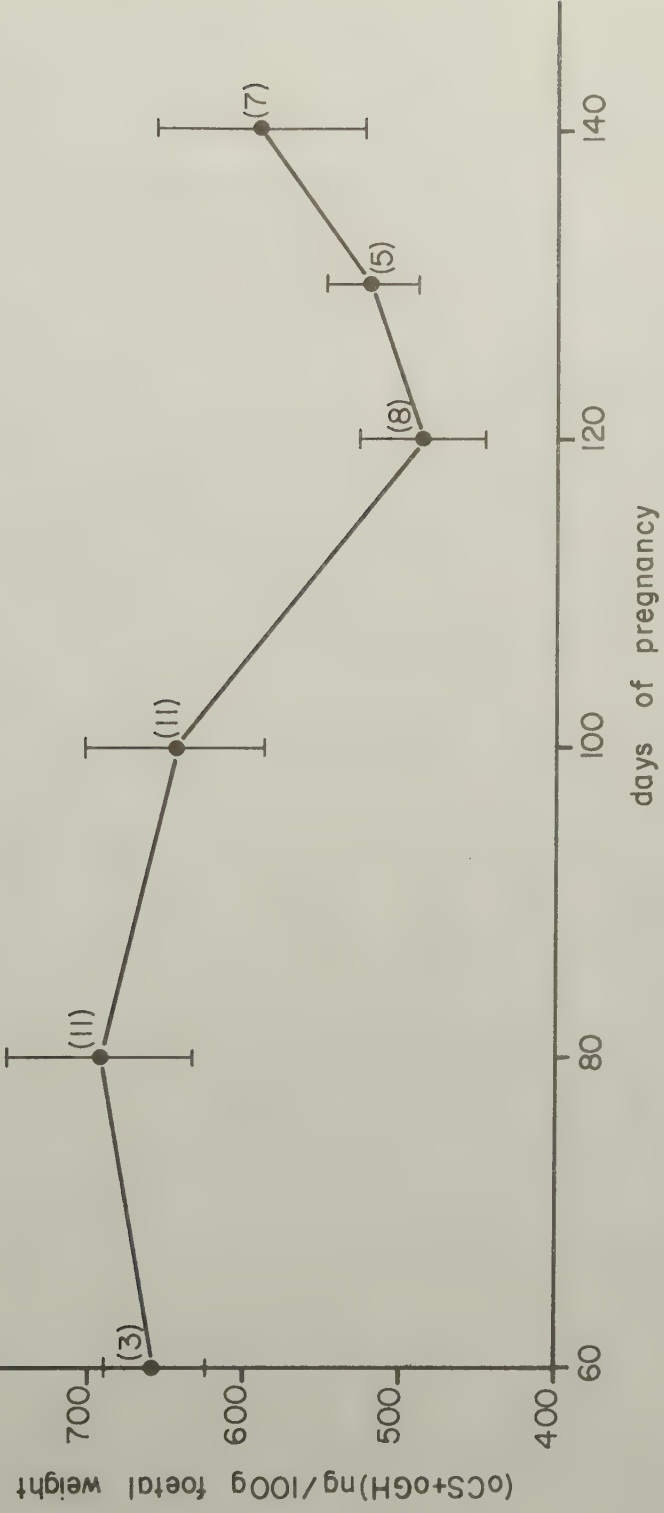


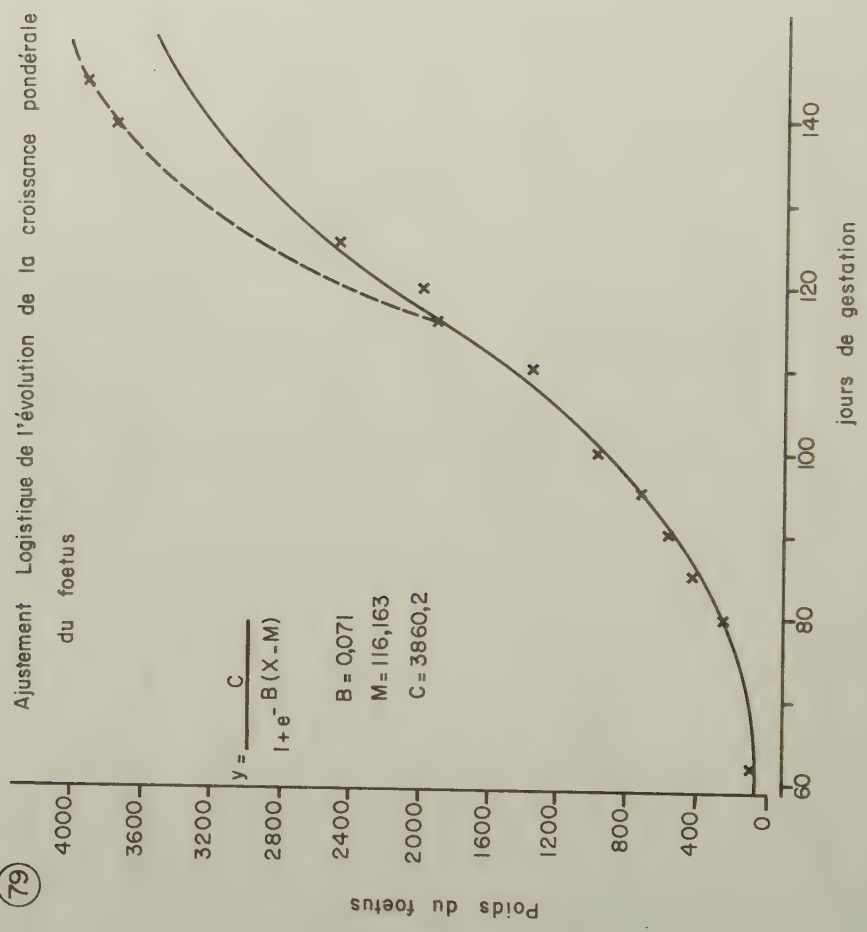
77

Relation linéaire entre le Poids du foetus et la quantité totale
d'activité de croissance (oCS + oGH) par foetus.



Changes of growth hormones activities in sheep foetuses





Un ajustement étroit entre l'activité de croissance totale circulante par fœtus et la croissance pondérale du fœtus est observé (Fig. 76). La relation linéaire entre le poids du fœtus et la quantité totale d'activité de croissance (oCS + oGH) par fœtus peut s'écrire (Fig. 77)

$$P_{(g)} = 172,5 \times_{(\mu g)} + 57,2$$

Le coefficient d'ajustement de la droite de régression est égal à 0,99.

Nous avons vu qu'en dépit de la croissance pondérale du fœtus, la concentration de l'activité somatotrope sérique totale (oCS + oGH) reste constante (Fig. 74). Cette concentration sérique exprimée par unité de poids reste donc également constante (Fig. 78).

e) Ralentissement de la croissance fœtale et activité des hormones de croissance circulantes

Lorsque l'on étudie par ordinateur l'évolution de la croissance pondérale du fœtus d'Agneau, il est possible d'obtenir du 45e au 120e jour de gestation un excellent ajustement des résultats expérimentaux à une courbe sigmoïde de type logistique (Fig. 79). L'équation d'une telle courbe est de la forme :

$$P = \frac{C}{1 + e^{-B(t-M)}}$$

P correspond au poids (g), t au temps (jours), et les constantes estimées à partir de nos valeurs expérimentales sont $B = 0,071$, $M = 116$ et $C = 3860,2$.

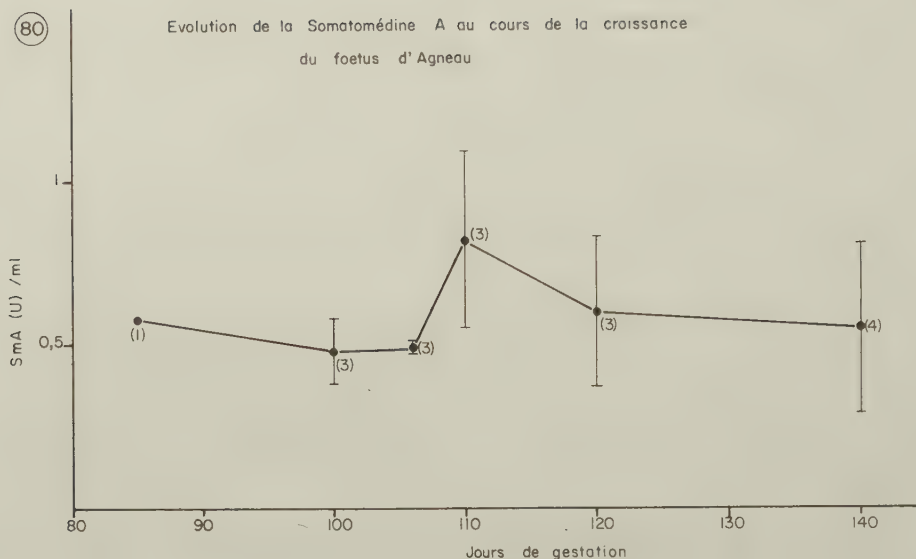
Mais les dernières valeurs expérimentales observées le 140e jour de gestation et au moment de la parturition s'éloignent considérablement de la courbe.

Il est intéressant de souligner que le point d'inflexion de cette sigmoïde se situe à 116 jours. Cette observation est en accord avec les résultats présents sur les Fig. 76 et 77.

A première vue, il peut paraître étonnant que la croissance pondérale puisse se ralentir au moment où l'hormone

80

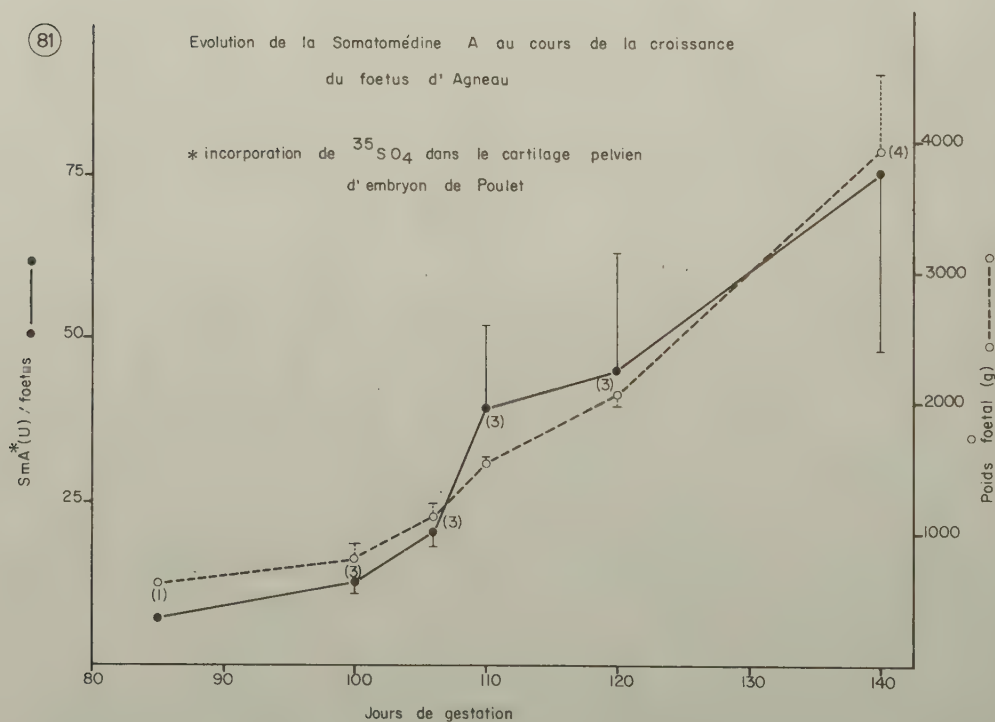
Evolution de la Somatomédine A au cours de la croissance
du fœtus d'Agneau



81

Evolution de la Somatomédine A au cours de la croissance
du fœtus d'Agneau

* incorporation de $^{35}\text{SO}_4$ dans le cartilage pelvien
d'embryon de Poulet



de croissance hypophysaire sérique est présente à des concentrations importantes qui s'élèveront encore jusqu'à la parturition. En réalité, ces courbes suggèrent qu'aux effets d'activité de croissance de l'oCS (courbe logistique) s'ajouteraient ceux de l'hormone de croissance hypophysaire.

3 - Ontogénèse de la somatomédine A et croissance foetale

Nous avons étudié, en collaboration avec Jacques CHARRIER, l'évolution de la concentration sérique de la somatomédine A chez le fœtus d'Agneau, tout au long de la gestation. La Sm A est un polypeptide neutre, GH dépendant, défini comme le facteur sérique capable de stimuler in vitro l'incorporation de sulfate radioactif ($^{35}\text{SO}_4$) dans le cartilage pelvien d'embryon de Poulet (UTHNE, 1973), ainsi que l'incorporation dans les cellules cartilagineuses de la thymidine dans l'ADN, de l'uridine dans l'ARN, de la leucine dans les protéines et de la proline dans l'hydroxyproline du collagène.

Du 85e au 140e jour de gestation, la concentration sérique de Sm A est pratiquement constante chez le fœtus d'Agneau. Elle s'élève en moyenne à $0,50 \pm 0,08$ Unité par ml ($n = 17$) (Fig. 80). Par suite, une étroite proportionnalité entre la croissance foetale et la quantité totale de Sm A par fœtus est obtenue (Fig. 81) ainsi qu'entre les quantités totales par fœtus de Sm A et d'activité sérique d'hormones de croissance (oCS + oGH) (Fig. 82). Les équations des régressions linéaires sont respectivement :

$$P_{(g)} = 51 \times (Sm A) - 58,8 \quad (\text{Fig. 83})$$

et

$$Y_{(Sm A)} = 6,18 \times (oCS + oGH) + 12,84 \quad (\text{Fig. 82})$$

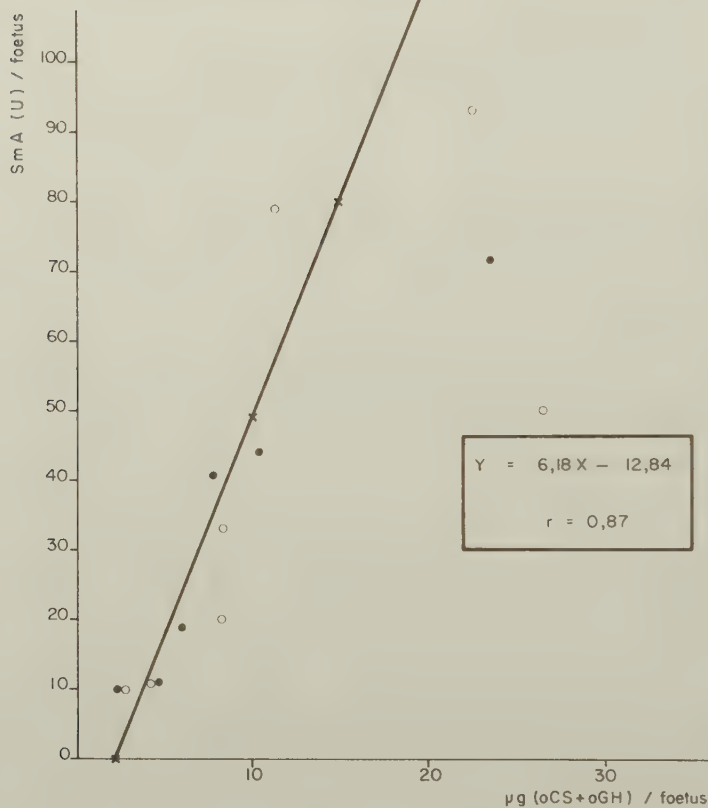
et les coefficients d'ajustement des données expérimentales aux valeurs calculées sont respectivement de 0,97 et 0,87

Ces résultats importants suggèrent donc très fortement, d'une part que la sécrétion de Sm A est directement proportionnelle à la concentration sérique en hormones de croissance (oCS + oGH) et, d'autre part, que la Sm A, comme l'oCS, est directement impliquée dans la croissance osseuse du fœtus.

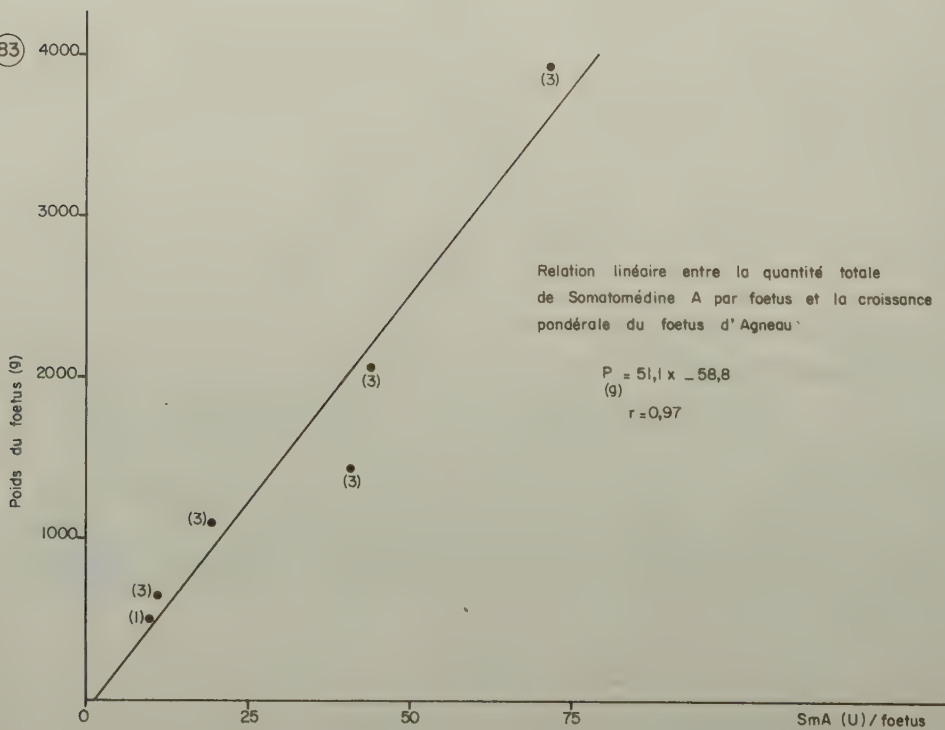
82

Régression linéaire entre les quantités
totales par fœtus de Sm A et d'activité
d'hormones de croissance (oCS + oGH)

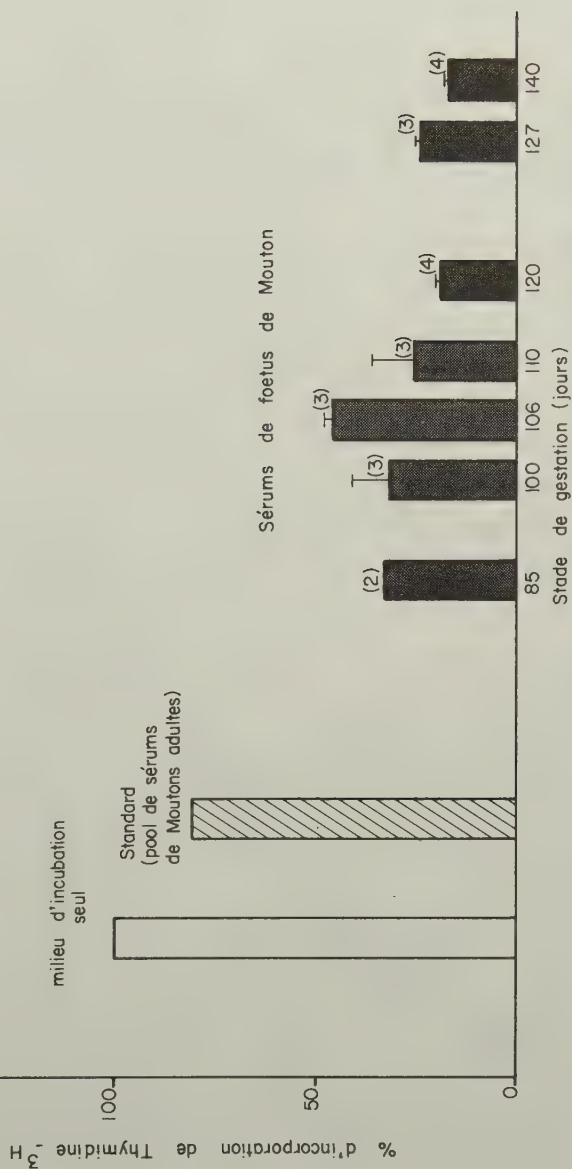
143



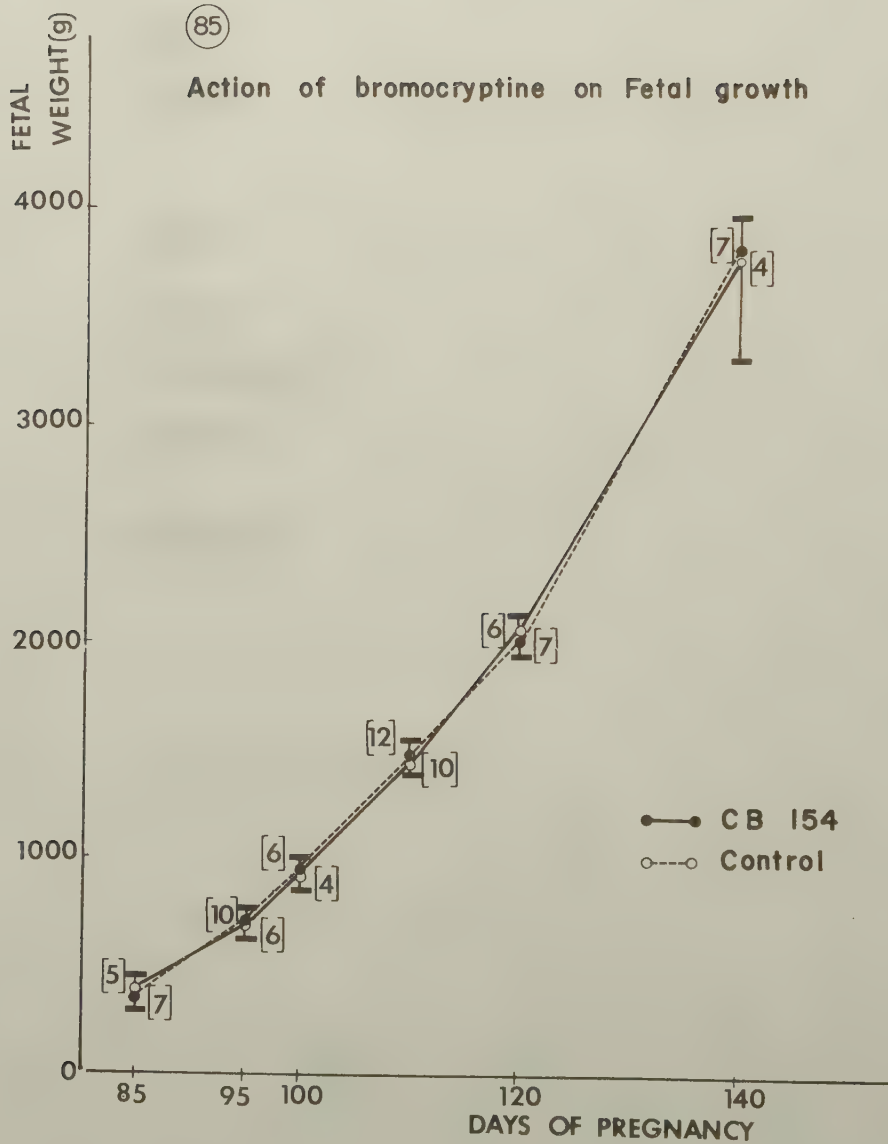
83



Effet inhibiteur des sérums de foetus de Mouton sur l'incorporation
de thymidine dans le cartilage pelvien de Poulet



Action of bromocryptine on Fetal growth



Néanmoins, dans nos expériences préliminaires, seuls trois sérums prélevés à partir de trois foetus jumeaux, âgés de 127 jours, présentèrent une inhibition de l'incorporation du sulfate, ce qui traduit l'existence d'un (ou plusieurs) facteur(s) inhibiteur(s) des précédents. En revanche, tous les sérums foetaux étudiés inhibèrent l'incorporation de la thymidine tritiée dans le DNA des chondrocytes (Fig. 84).

En effet, en présence de sérums foetaux à des stades variés de gestation l'incorporation de thymidine n'est que de $27 \pm 3 \%$ ($n = 22$) de celle obtenue avec du milieu d'incubation dépourvu de sérums, et estimée à 100 %. Le sérum standard, composé d'un pool de sérums de moutons adultes, permet une incorporation égale à 80 % de cette valeur.

L'absence de corrélation entre les incorporations de $^{35}\text{SO}_4$ et de thymidine ^3H suggère donc une dissociation des activités somatomédines, et par suite, l'existence de multiples facteurs sériques.

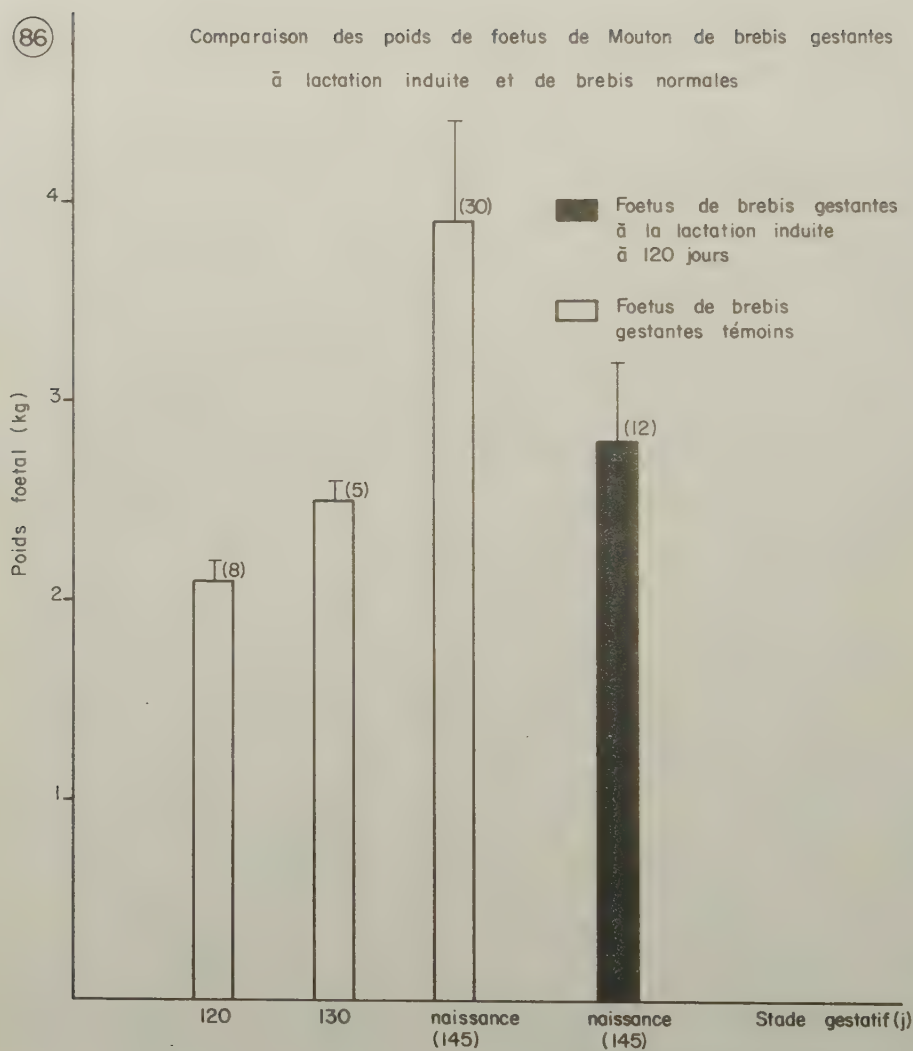
4 - Croissance foetale et prolactine

Bien que la prolactinémie maternelle puisse augmenter de façon considérable dans le dernier tiers de la gestation (KANN et DENAMUR, 1974), la prolactinémie foetale est particulièrement basse avant le 120e jour de gestation et ne s'élève que tardivement (à 130-140 jours) et de manière extrêmement variable d'un animal à l'autre. Aussi avons-nous voulu savoir si une suppression sub-totale prolongée de la prolactine pouvait perturber la croissance foetale.

Lorsque l'on administre à des brebis, du 70e au 140e jour de gestation, de la 2-bromo- α -ergocryptine (2 mg/j) aucune différence significative n'est observée entre la croissance des foetus des animaux traités et celle des témoins (Fig. 85) (MARTAL et LACROIX, 1978, P_{19x}). L'hypoprolactinémie maternelle causée par la bromocryptine (Tableau XXI) n'affecte donc pas la croissance pondérale des foetus et aucune anomalie morphologique n'est constatée.

Les concentrations sériques de prolactine foetale

Comparaison des poids de foetus de Mouton de brebis gestantes
à lactation induite et de brebis normales



(Tableau XX) ne semblent pas être affectées par la bromocryptine, ce qui suggère que cette drogue ne traverse pas la barrière placentaire, mais cette hypothèse ne peut être confirmée en raison de la grande variabilité spontanée de la prolactinémie foetale.

5 - Croissance foetale et lactation induite

Lorsque l'on injecte à partir du 120^e jour de gestation, du cortisol (50 mg/j) à des brebis gestantes que l'on traite matin et soir, une abondante production laitière est provoquée (MARTAL et DJIANE, 1977, P_{15x}). Bien que les animaux reçoivent du foin ad libitum et que la ration de concentrés soit nettement augmentée, il semble que la brebis gestante ne soit pas capable de faire face, à la fois et de manière satisfaisante, à la production laitière et à l'édification du foetus. Aussi le poids à la naissance de ce dernier est-il nettement diminué : $2,8 \pm 0,4$ kg (n = 12) contre $3,9 \pm 0,5$ kg (n = 30) (Fig.86) chez les témoins (MARTAL, 1979, P_{25x}). Cependant bien que des mensurations systématiques n'aient pas été effectuées, la croissance des agneaux plus petits paraissait harmonieuse.

Un mois de lactation a entraîné un retard de croissance des foetus de 28 %, ce qui correspond à 15 jours de retard de croissance.

DISCUSSION

1 - Activité de croissance de l'oCS

L'activité de croissance des préparations d'oCS a été démontrée sur la croissance osseuse (CHAN et coll., 1976 MARTAL et DJIANE, 1977, P_{14x}) et la croissance pondérale de rats hypophysectomisés (MARTAL, 1978, P_{17x}). Ces résultats sur l'activité de croissance de l'oCS sont en accord avec la

proportionnalité entre le gain total de poids des jumeaux et la production d'oCS étudiée au Chapitre précédent (MARTAL et DJIANE, 1977, P_{15x} ; THIMONIER et coll., 1977, P₂₀). Cette activité de croissance est comparable à celle d'autres hormones lactogènes placentaires (Tableau I). Nous avons discuté au Chapitre I les propriétés respectives de ces diverses hormones.

Dès les premiers stades de la croissance embryonnaire (16e jour) l'oCS est présente dans le trophoblaste (MARTAL et DJIANE, 1977, P_{15x}). Pendant le premier mois de gestation, l'embryon croît de manière exponentielle ainsi que la quantité d'oCS par trophoblaste.

Cette présence très précoce de somatomammotrophine chorionique est en parfait accord avec l'apparition également précoce (BOSCHIER, 1969) des cellules binucléées, PAS positive, productrices d'oCS (DUBOIS et coll., 1976 ; MARTAL et coll. 1977, Chapitre VI).

A ces stades du développement embryonnaire, l'hormone de croissance hypophysaire n'est pas encore apparue. Elle n'a été mise en évidence, au plus tôt, qu'à partir du 50e jour de gestation (STOCKES et BODA, 1968 ; BASSETT et coll., 1970).

2 - Courbes de croissance foetale

Du 60e au 145e jour de gestation une étroite proportionnalité entre la croissance foetale et la quantité totale d'activité d'hormones de croissance circulantes (oCS + oGH) a été mise en évidence. En fait, l'hormone de croissance hypophysaire, dont l'activité spécifique est équivalente à celle de l'oCS (Tableau I), circule à des concentrations nettement inférieures à celles de l'oCS : à 120 jours, c'est-à-dire au 4/5e de la gestation, la concentration d'oCS foetale (exprimée en activité oGH, N.I.H.) est encore le double de celle de l'oGH. Ce n'est que près de la parturition que les taux sériques de ces deux hormones sont équivalents. Alors que l'hypophysectomie d'un Agneau à la naissance arrête sa croissance dès l'âge de 10 jours (VEZINHET, 1968 ; CHARRIER, 1973)

l'hormone de croissance hypophysaire n'est pas indispensable à la croissance du fœtus. En effet, chez la Brebis, l'hypophysectomie foetale (LIGGINS et KENNEDY, 1968), comme d'ailleurs la thyroïdectomie (HOPKINS et THORBURN, 1972) ne provoque qu'un léger retard de croissance.

De même, la décapitation de fœtus de Lapin (JOST, 1947) ou de Rat (JOST, 1951) n'est pas suivie de retard de croissance somatique. Chez l'Homme et les Bovins également, des fœtus anencéphales peuvent présenter un poids normal à la naissance (BREWER, 1957 ; CHO et LEIPOLD, 1978).

Mais les mécanismes de la régulation hormonale de la croissance foetale ne sont pas clairs (CHARRIER, 1973 ; JOST, 1977, 1979). Dans l'ensemble des espèces étudiées, la croissance du fœtus paraît pouvoir se passer, du moins en grande partie, de l'hormone de croissance d'origine hypophysaire. Chez les espèces qui possèdent une hormone placentaire à activité de croissance (Primates, Ruminants, Cobaye - Chapitre I, Tableau I et II), le placenta pourrait donc être le principal organe de régulation du développement foetal.

Les courbes de croissance foetale montrent que la racine cubique du poids est proportionnelle à l'âge gestatif. L'intersection de cette droite avec l'axe des temps met en évidence qu'il faut distinguer dans la croissance foetale, une première phase jusqu'à environ 40 jours caractérisée par un développement de type exponentiel et une forte croissance pondérale relative pendant laquelle seule l'oCS est présente, et une seconde phase linéaire. Durant cette dernière phase, l'activité de l'OGH s'ajoute progressivement à celle de l'oCS et la vitesse de croissance ne fait qu'augmenter.

La représentation logistique de la croissance foetale de l'Agneau fait nettement apparaître un point d'inflexion de la sigmoïde à 116 jours de gestation. La croissance du fœtus a donc tendance à se ralentir à partir de cette date. De même, nous avons observé un fléchissement de la concentration sérique de l'activité totale d'hormones de croissance (oCS + oGH) par Unité de volume ou de poids. Puisqu'avant 100 jours de gestation c'est surtout l'activité de croissance

de l'oCS qui est abondante, ces résultats suggèrent que la courbe logistique représente surtout la croissance foetale due à l'oCS et que l'aire comprise entre la logistique et les valeurs expérimentales de fin de gestation, correspond essentiellement à l'action de l'hormone de croissance hypophysaire. Une telle analyse suppose que la croissance foetale dépend de la somme des effets conjugués des activités de croissance d'origine placentaire et hypophysaire (ou thyroïdienne), et que l'activité de la somatomammotrophine chorionique est nettement prépondérante. Cette interprétation des résultats expliquerait également, en partie, que l'hypophysectomie ou la thyroïdectomie du fœtus d'Agneau ne bloque pas sa croissance et ne provoque qu'un léger retard.

Ces remarques expliqueraient encore que la croissance postnatale est très ralentie par rapport à la croissance foetale puisque la composante placentaire est absente. Enfin on pourrait très bien concevoir que la présence de la composante hypophysaire puisse être accessoire chez certaines espèces, voire même inutile à la croissance foetale (Lapin, Rat). Dans ces deux cas il faudrait toutefois concevoir une source substitutive d'activité de croissance. Nous examinerons cet aspect à la fin de la "Discussion".

3 - Somatomédines

L'activité des hormones lactogènes placentaires sur la croissance osseuse se manifeste probablement, comme celle de l'hormone de croissance hypophysaire, par l'intermédiaire de somatomédines directement actives sur le tissu cartilagineux.

En effet, l'injection d'oCS à des rats hypophysectomisés augmente la concentration circulante de somatomédine (HURLEY et coll., 1977) alors que chez la Brebis l'ablation de caroncules maternels avant la gestation la diminue significativement (FALCONER et coll., 1977) ainsi que le poids de naissance des agneaux (ALEXANDER, 1964). Puisque les somatomédines sont sécrétées par le foie (Mc CONAGHEY et SLEDGE, 1970 ; UTHNE, K. et UTHNE, T., 1972 ; SCHIMPF et coll., 1976)

la liaison de l'oCS (Chapitre II) ou de la bCS (DJIANE et coll., 1975 ; MARTAL, 1979, P_{25x}) aux sites récepteurs de croissance des membranes d'hépatocytes, est en accord avec le mode d'action de ces hormones sur la production de somatomédines. La forte corrélation obtenue ($r = 0,87$) entre les quantités totales par fœtus d'activités d'hormones de croissance (oCS + oGH) et de Sm A est donc rationnelle.

De plus, l'étroite proportionnalité entre la croissance fœtale et la quantité de somatomédine A sérique observée au cours de l'étude longitudinale chez la Brebis est en accord avec l'étude transversale de CHARRIER (1979) chez le fœtus de Porc. De même, chez l'Homme les poids fœtaux ont été corrélés à la concentration de somatomédine sérique estimée par l'incorporation du SO_4^{--} dans le cartilage costal de Porc in vitro (GLUCKMAN et BRINSMEAD, 1976), et par dosage radiorécepteur de Sm C (UNDERWOOD et coll., 1978). Une corrélation positive a également été établie entre le poids de bébés à la naissance et la somatomédine insulin-like, l'I.G.F. (Insulin-like Growth Factor) (HEINRICH et coll., 1978).

Il est étonnant à première vue que le taux sérique de Sm A ($0,50 \pm 0,08$ U/ml, $n = 17$) soit si faible chez le fœtus de Mouton. En effet, par référence à l'Unité Sm, il est égal à la moitié de celui de l'Adulte alors que l'activité Sm A d'un sérum d'Acromégale s'élève à environ 3 U/ml (TAKANO et coll., 1976) et que celle d'un nain hypophysaire n'est que de 0,4 U/ml. Mais ce faible taux de Sm fœtale est en fait assez général. L'activité Sm A de l'enfant à la naissance n'est que de 0,4 U/ml et demeure à ce taux jusque vers deux ans (TAKANO et coll., 1976). Celle du Lapin nouveau-né est de 0,5 U/ml et s'élève à environ 1 U/ml vers 6 mois (CHARRIER, 1978). Chez le fœtus de Porc, l'activité Sm A n'est que de 0,2 U/ml (CHARRIER, 1979). En réalité, l'activité Sm A déterminée chez le fœtus est la résultante des activités stimulatrices et inhibitrices sur l'incorporation du sulfate dans le tissu cartilagineux.

Chez le fœtus de Mouton les facteurs inhibiteurs de Sm A seraient comparables à ceux du fœtus humain mais les

facteurs inhibiteurs de l'incorporation de la thymidine seraient particulièrement élevés puisque l'inhibition sérique moyenne est d'environ 75 % (74 ± 3 %, $n = 17$). La présence d'une activité inhibitrice a d'ailleurs été démontrée chez le Rat (SALMON, 1972), le Lapin et le Porc (CHARRIER, 1978, 1979). GARLAND et coll. (1979) ont observé chez le Rat, comme nous chez le foetus d'Agneau, une activité stimulatrice des sérums sur l'incorporation des sulfates dans les chondrocytes et une activité inhibitrice sur l'incorporation de la thymidine. Chez le Porc, par contre, les sérums foetaux inhibent à 80 % l'incorporation du sulfate et stimulent celle de la thymidine dans le chondrocyte d'embryon de Poulet (CHARRIER, 1979). Mais la nature de ces facteurs inhibiteurs reste encore mal connue.

SALMON (1972) a réalisé à partir de sérums de Rat une purification partielle d'un peptide inhibiteur de la sulfatation.

Toutefois d'autres substances ont des activités similaires. Les glucocorticoïdes inhibent in vivo (PHILIPS et coll., 1975) et in vitro (EISENBARTH et LEOVITZ, 1974 ; TESSLER et SALMON, 1975 ; RAPPAPORT et CORVOL, 1978) l'incorporation du sulfate dans le cartilage ; l'oestradiol n'a pas d'effet in vitro mais réduit in vivo l'activité circulante de somatomédine (WIEDEMANN et SCHWARTZ, 1972 ; PHILIPS et coll. 1975).

Ces résultats suggèrent que la croissance osseuse observée est la résultante de l'intervention de nombreux facteurs sériques positifs et négatifs, encore mal caractérisés. Le rapport de ces diverses composantes peut varier considérablement au cours de la gestation ou après la naissance, et d'une espèce à l'autre. Le contrôle de ces facteurs est également mal connu (VAN DEN BRANDE et VAN BUUL, 1978 ; RAPPAPORT et CORVOL, 1978). Enfin la multiplicité des somatomédines (A, C, IGF et MSA*) et des facteurs de croissance indépendants

*MSA : Multiplication Stimulating Activity (HALL et coll., 1976)

de l'hormone de croissance (EGF*, NGF*, FGF*, MSF*) ne permet de faire un bilan précis dans aucune espèce.

4 - La prolactine est l'un des facteurs impliqués dans la régulation des somatomédines. En effet, la perfusion de prolactine stimule la production de somatomédine C par le foie de Rat (FRANCIS et HILL, 1975). Administrée à des rats hypophysectomisés, la prolactine est capable d'augmenter l'activité somatomédine sérique. L'ACTH, à faible dose, amplifierait d'ailleurs cet effet (BALA et coll., 1978). Chez des Souris naines, la prolactine bovine induit simultanément la croissance de ces animaux et la production de somatomédine C (HOLDER et WALLIS, 1977). Chez des patients déficients en hormone somatotrope, la prolactine ovine aurait présenté quelques effets sur leur croissance (Mc GARRY et BECK, 1972).

Pour notre part, nous avons signalé que, chez la Lapine, la prolactine ovine à forte concentration, pouvait se fixer sur les récepteurs hépatiques à l'hormone de croissance (Chapitre II).

Néanmoins, en dehors de toute contamination de la prolactine par l'hormone de croissance (Tableau IV), la prolactine de Mammifères est dépourvue d'activité dans le test du tibia de rats hypophysectomisés.

Nous avons vu que le traitement prolongé de brebis gestantes par la bromocryptine ne perturbe pas, apparemment, la croissance foetale (MARTAL et LACROIX, 1978, P_{19x}).

Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec l'observation clinique suivante : des femmes enceintes, souffrant de tumeur hypophysaire et traitées par la bromocryptine, donnèrent naissance à des bébés normaux (del POZO et coll., 1977).

Chez la Brebis, en raisons de la variabilité et des faibles taux de prolactinémie foetale, il est difficile

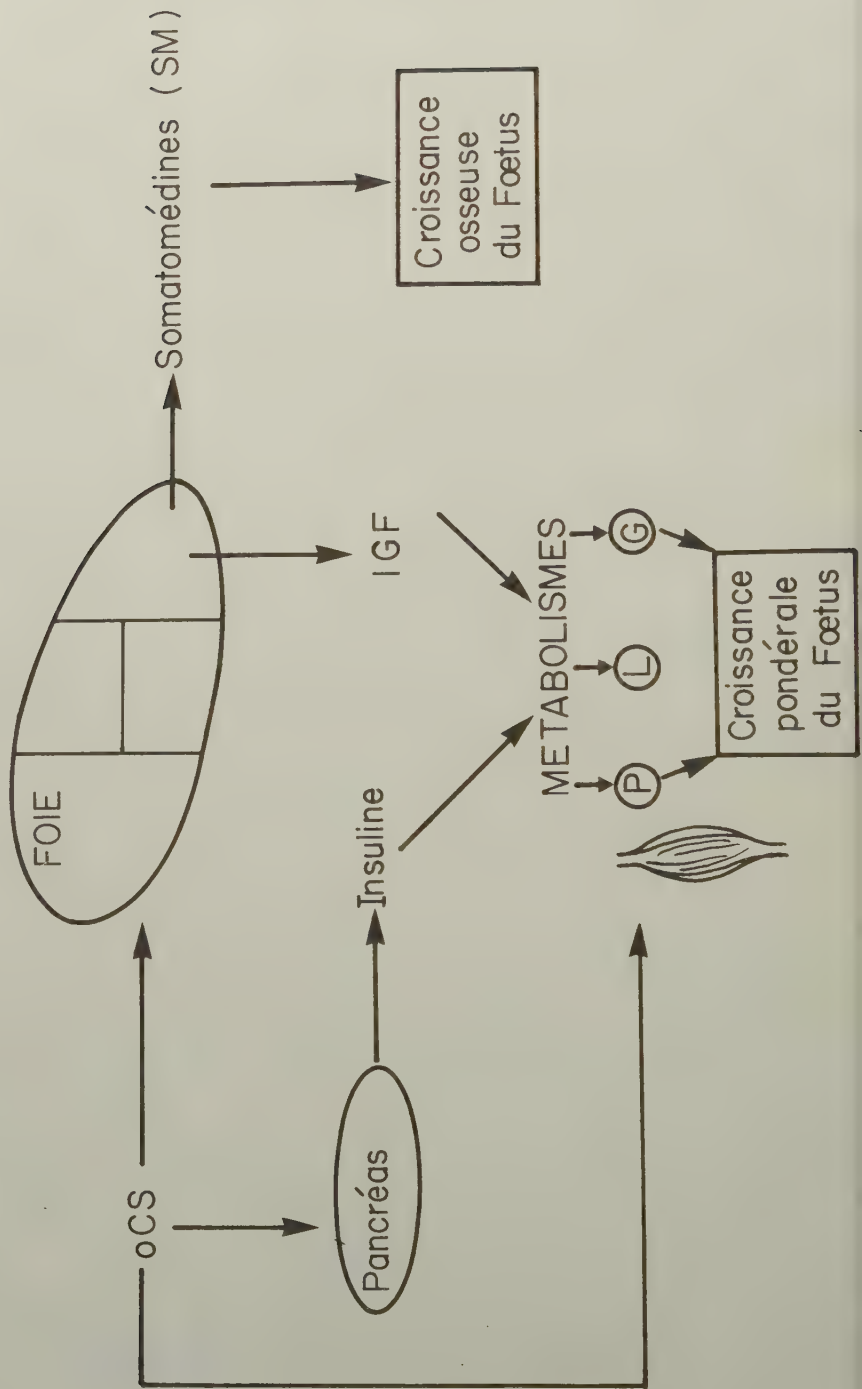
*EGF : Epidermal Growth Factor (COHEN, 1962).

NGF : Nerve Growth Factor (ANGELETTI et BRADSHAW, 1972).

FGF : Fibroblast Growth Factors (GOSPODAROVICZ, 1974).

MSF : Mammary Stimulating Factor (PTASHNE et coll., 1979).

Modes d'action possibles de l'oCS sur la croissance fœtale.



de savoir si la bromocryptine a traversé la barrière placentaire. De plus, aucune source importante de prolactine foetale n'est fournie par le liquide amniotique ($4,7 \pm 3,1$ ng/ml, $n = 27$). Il en résulte que la prolactine ne semble pas jouer de rôle important dans la croissance du foetus de Mouton.

5 - L'apport maternel de nutriments est évidemment essentiel à la croissance foetale. Lorsque l'on dévie partiellement le métabolisme maternel d'une brebis gestante vers la production de lait, nous observons un retard de croissance foetale comparable à celui provoqué par une restriction alimentaire sévère au cours du dernier tiers de la gestation (WALLACE, 1946; RUSSELL et coll., 1967 ; REMESY et DEMIGNE, 1979). Une lactation est beaucoup plus épuisante qu'une gestation et la Brebis semble être incapable d'assumer simultanément, de façon satisfaisante, ces deux fonctions. Par contre, chez la Vache et chez la Chèvre, la juxtaposition naturelle d'une lactation à une gestation est possible. La lactation diminue toutefois au cours de la gestation. De plus, il est nécessaire d'interrompre la lactation d'une Vache au moins un mois avant la parturition pour éviter l'épuisement de la mère.

En raison de la complexité des problèmes soulevés, les métabolismes du foetus et le contrôle endocrinien de leur régulation seront discutés dans un Chapitre spécial (Chapitre IX). La Figure 87 résume toutefois les principaux aspects des modes d'action possibles de l'oCS dans la régulation de la croissance foetale.

6 - Autres facteurs impliqués dans la régulation de la croissance foetale

Nous avons observé que de nombreux facteurs positifs (somatomédines) et négatifs encore mal connus, contrôlés par de multiples hormones (hormone lactogène placentaire, GH, thyroxine, ACTH, prolactine, glucocorticoïdes, oestradiol) sont les intermédiaires des hormones qui contrôlent la croissance osseuse.

La nature des nutriments foetaux sera analysée dans le Chapitre suivant ainsi que l'importance de l'insuline et

de la somatomédine IGF dans la régulation de la croissance pondérale. Nous ne développerons pas ici le rôle des hormones thyroïdiennes indépendant des hormones lactogènes placentaires.

La spécificité plus ou moins étroite des récepteurs somatotropiques ajoute encore un nouveau degré de complexité au contrôle de la croissance foetale. La régulation de ces récepteurs est encore très mal connue (GERASSIMO et coll., 1979). L'insuline stimulerait toutefois le nombre de récepteurs à l'hormone de croissance (BAXTER et coll., 1979). Et l'on sait que l'OCS stimule l'insulinémie (HANDWERGER et coll. 1976) et probablement la production d'IGF (HURLEY et coll., 1977 ; FALCONER et coll., 1977).

Les reins du fœtus peuvent jouer encore un rôle déterminant dans l'activation des hormones de croissance.

En effet, l'absence congénitale de reins chez l'enfant (BAIN et SCOTT, 1960) ou la néphrectomie bilatérale des fœtus de Mouton (THORBURN, 1974) ou de Lapin (BERTON, 1971) provoquent un nanisme foetal en dépit de taux sériques élevés d'hormone de croissance immunoréactive.

Ces résultats expérimentaux ne peuvent être raisonnablement expliqués par la suppression de somatomédine rénale car les reins n'en contiennent que de faibles quantités (DAUGHADAY et coll., 1975), mais ils pourraient être expliqués par la suppression d'un facteur protéolytique rénal, activateur d'hormone de croissance, susceptible d'éliminer à la manière de la plasmine (SINGH et coll., 1974 ; YADLEY et CHRAMBACH, 1974 ; CHRAMBACH et coll., 1974 ; KOSTYO, 1974 - Chapitre V) le peptide inhibiteur (135-140) de l'activité de croissance des hormones somatotropes et des hormones lactogènes placentaires. BAUMAN et NISSLEY (1979) viennent d'ailleurs de montrer que des isohormones de l'hGH, activées par la plasmine, stimulent davantage la production de somatomédine que ne le fait la forme native d'hGH. De plus des homogénats de reins présentent une activité protéolytique intense (WALLACE et coll., 1970 ; STACY et coll., 1976).

Enfin la régulation protéolytique de nombreux mécanismes physiologiques a été récemment démontrée (BEERS et coll. 1975 ; HAMILTON et coll., 1976 ; VASSALI et coll., 1977).

7 - Contrôle de la croissance foetale selon les espèces

Si la Brebis peut jouer le rôle d'un modèle physiologique très stimulant grâce notamment à la présence de l'activité de croissance de l'oCS, il ne faut pas oublier que certaines espèces ne possèdent qu'une hormone lactogène placentaire à activité de croissance minime ou nulle et d'autres ne possèdent même pas cette hormone.

Il est toutefois possible d'essayer d'expliquer partiellement ces différences de régulation en faisant remarquer que la spécificité des récepteurs à l'hormone de croissance n'est pas toujours très stricte (Chapitre II, GERASSIMO et coll., 1979) puisque la prolactine ou l'hCS se fixent sur ces récepteurs. De plus nous avons souligné que la prolactine pouvait stimuler la production de somatomédines (FRANCIS et HILL, 1975 ; BALA et coll., 1978 ; HOLDER et WALLIS, 1977 ; Mc GARRY et BECK, 1972).

En fait, il convient sans doute de distinguer plusieurs catégories d'espèces.

Certaines possèdent une sécrétion abondante de somatomammotrophine chorionique qui présente une activité de croissance élevée. Cette hormone pourrait jouer un rôle crucial dans le contrôle de la croissance foetale. C'est le cas de la Brebis et probablement de la Vache, de la Chèvre, du Cobaye et du Singe. Sans nier l'importance de l'hormone de croissance hypophysaire, son rôle serait sans doute secondaire. Il en serait de même des hormones thyroïdiennes en dépit de leur intervention dans la maturation osseuse.

D'autres espèces possèdent une hormone lactogène placentaire dont l'activité de croissance est nulle (Ratte, Souris, Chinchilla) ou presque nulle (Femme). Dans ce dernier cas, les concentrations sériques foetales d'hCS sont basses (KAPLAN et GRUMBACH, 1965 ; MARTAL, 1967, P_{1x}) et ne compensent pas la faible activité spécifique de l'hormone. Il s'ensuit que l'activité de croissance circulante est dérisoire et divers mécanismes de régulation de la croissance foetale peuvent être proposés.

L'hormone lactogène placentaire par son activité prolactinique et la prolactine amniotique quand elle existe (Primates - WANG et coll., 1971 ; TYSON et coll., 1972 ; JOSIMOVICH et coll., 1977), pourraient participer à la régulation de la production des somatomédines.

Enfin, un troisième groupe d'espèces ne possède pas d'hormone lactogène placentaire (Chatte, Chienne, Truie, et sans doute Lapine). La présence d'hypophyse foetale a été démontrée comme non indispensable à la croissance des foetus chez certaines d'entre elles (Lapine). A moins que l'on imagine que la croissance foetale puisse se passer d'hormones de régulation, ce qui est à priori peu probable d'après ce que l'on observe dans la croissance post-natale et en raison des multiples signaux de régulation de toute fonction physiologique, il convient de songer à d'autres mécanismes possibles. La multiplicité des peptides stimulants et inhibiteurs de la croissance squelettique ou de la croissance pondérale (IGF) suggère de nombreuses possibilités. Le nombre élevé d'hormones intervenant dans la régulation de ces peptides sériques permet de concevoir diverses hypothèses. De plus, la régulation endocrinienne du nombre de récepteurs et l'activation éventuelle de pro-facteurs somatotropes circulants doivent être considérés.

CHAPITRE IX

Activités métaboliques probables de l'oCS

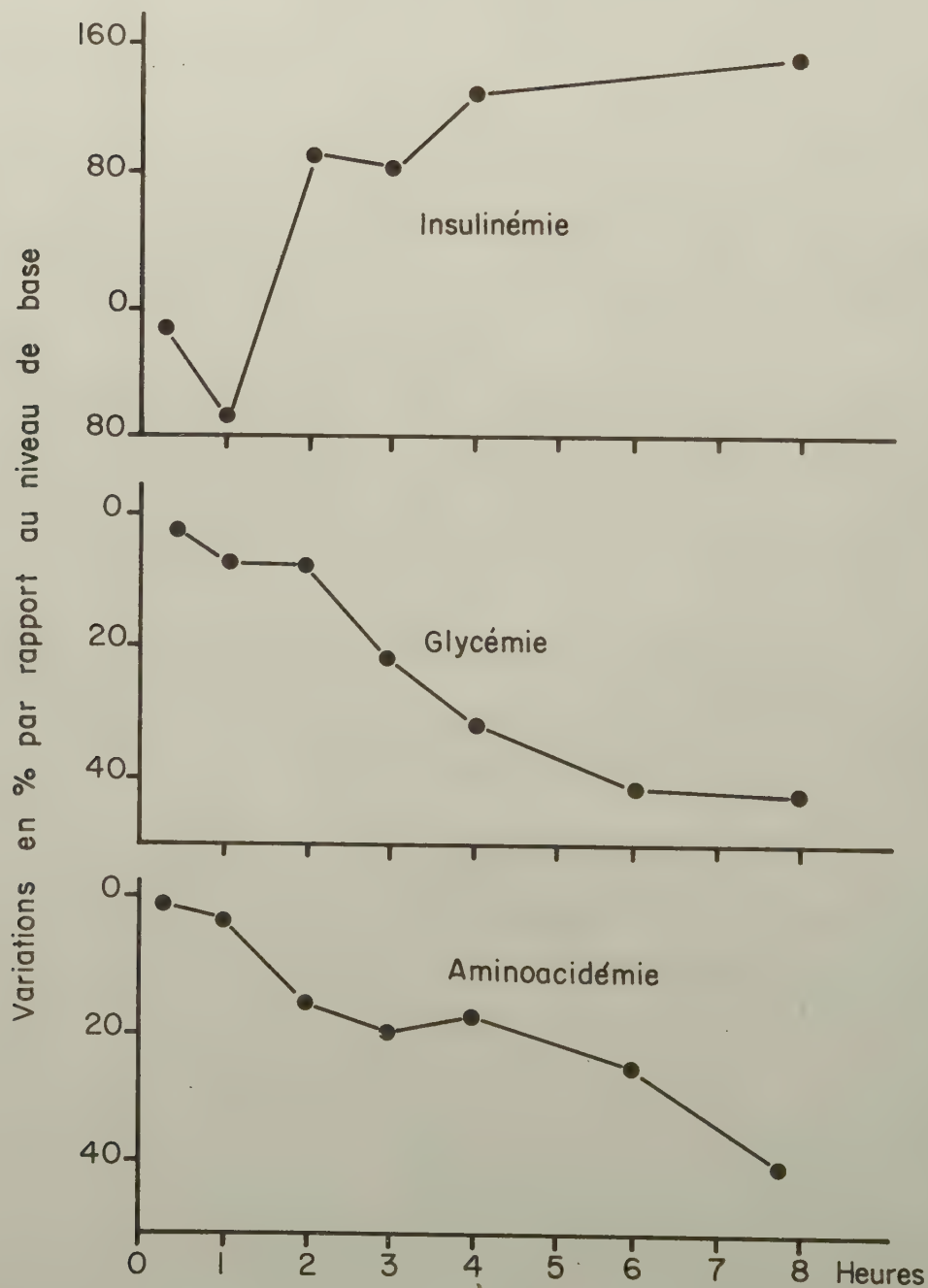
La compréhension du contrôle endocrinien de la gestation et de la croissance foetale suppose la connaissance des divers métabolismes et de leur régulation.

Le caractère bicéphale de l'oCS suggère que cette hormone peut posséder à la fois des activités métaboliques de l'hormone somatotrope et (ou) de la prolactine. Mais l'isolement et la purification de cette hormone placentaire est encore très récente et ses propriétés métaboliques ont été très peu étudiées.

Par contre, les propriétés métaboliques de l'hCS sont bien connues (MARTAL, 1967, P₁, GRUMBACH & coll., 1968) et l'on peut prévoir raisonnablement une grande analogie entre les propriétés de ces deux hormones.

Nous nous baserons donc dans ce chapitre, d'une part, sur la connaissance du métabolisme des ruminants et, d'autre part, sur les propriétés de l'OGH, de l'oPRL et de l'hCS pour essayer de prévoir les activités métaboliques possibles de l'oCS.

88 Effet de l'oCS sur le métabolisme intermédiaire
de la brebis d'après HANDWERGER et al. (1976)



I) METABOLISME GLUCIDIQUE ET oCS

L'injection d'hormone lactogène placentaire ovine à des brebis provoque une hyperinsulinémie suivie d'une hypoglycémie (HANDWERGER & coll., 1976, Fig. 88). En raison des mécanismes connus de la régulation de la sécrétion d'insuline, cette hyperinsulinémie est probablement secondaire à une courte hyperglycémie, non observée par les auteurs en raison des prélèvements sanguins trop espacés, (toutes les heures).

Cette stimulation de la sécrétion d'insuline par l'oCS est en accord avec divers résultats obtenus avec l'hCS ou l'hormone de croissance. En effet, lors d'hyperglycémies provoquées par injection de glucose chez la Femme, la sécrétion d'insuline est accentuée en présence d'hGH, et encore plus, en présence d'hCS (GRUMBACH & coll., 1968). L'administration d'hCS (MARTIN & FRIESEN, 1969) ou de bGH (MARTIN & GAGLIARDINO, 1967) pendant plusieurs jours à des rats hypophysectomisés, favorise in vitro, à partir d'incubation de fragments de pancréas, la synthèse et la sécrétion de l'insuline stimulée par une forte concentration de glucose. Bien que le mode d'action précis de l'hCS et de la bGH n'ait pas été discuté par les auteurs, ces expériences suggèrent que la synthèse de glucorécepteurs des cellules du pancréas a été induite par ces hormones injectées pendant les jours précédents la stimulation par le glucose.

Bien que l'hormone lactogène placentaire humaine favorise la sécrétion d'insuline, elle présente comme l'hormone de croissance, un effet antiinsulinique sur la glycémie en s'opposant à l'action hypoglycémiante de l'insuline. En effet, après injection simultanée d'hCS et d'hGH à des ratte, quatre heures avant une épreuve d'hypoglycémie provoquée par injection d'insuline, la glycémie diminue alors beaucoup moins à la suite du prétraitement par ces deux hormones (JOSIMOVITCH, 1966).

* A la suite de travaux récents, un nouveau système de régulation de la sécrétion de l'insuline pourrait également impliquer la modulation de l'Activateur du Plasminogène des Ilots de Langerhans (VIRJI, M.A.G., VASSALI, J.D., ESTENSEN, R.D., REICH, E., PNAS (1980) 77, 875-879.

L'hormone lactogène placentaire humaine favorise donc, d'une part, la sécrétion de l'insuline et "tamponne", d'autre part, la réponse de la glycémie à cette sécrétion d'insuline. Cette double action est favorable, d'un côté, au maintien de la glycémie pendant la gestation, et, de l'autre, aux rôles anaboliques de l'insuline nécessaire à la croissance foetale.

L'insuline semble stimuler, en effet, la croissance pondérale du foetus. Il est connu depuis longtemps que les bébés de femmes diabétiques sont plus gros à la naissance que les bébés normaux (CARDELL, 1953). Il existe, le dernier jour de gestation, une excellente corrélation entre le poids des foetus de Rat et l'insulinémie foetale (GIRARD & coll., 1976). Lors de diabètes expérimentaux chez le Singe (MINTZ & coll., 1972), on peut voir que l'augmentation pondérale des foetus provient d'une augmentation du tissu adipeux et des protéines (FEE & WEILL, 1963 ; NAYE, 1965).

La croissance pondérale du foetus obtenue par injection d'oCS (MARTAL, 1978, P₁₇ x) de bCS (BOLANDER & FELLOWS, 1976 b) ou d'hCS (FLORINI & coll., 1966) peut donc être amplifiée par la stimulation de la sécrétion d'insuline.

Malgré les taux sanguins élevés d'acides gras libres maternels, c'est le glucose qui est le principal métabolite du foetus de Ruminant (ALEXANDER & coll., 1966). En effet, les acides gras libres traversent très peu la barrière placentaire chez la Brebis et chez la Vache (SILVER & coll., 1973). La glycémie foetale (0,2 g/l) est toutefois encore plus basse chez le foetus d'Agneau que chez sa mère (0,5 g/l) (COMLINE & SILVER, 1970).

Elle est directement dépendante de la glycémie maternelle; en effet, lors de jeûne maternel, l'insulinémie foetale décroît de façon significative (BASSETT & MADILL, 1974). Néanmoins, le foetus d'Agneau présente très tôt sa propre régulation de la glycémie par l'insuline (BASSETT &

MADILL, 1974 ; SHELLEY & coll., 1975) : les variations de l'insulinémie foetale sont indépendantes de celle de l'insulinémie maternelle. L'abondance de récepteurs placentaires à l'insuline des côtés maternel et foetal est probablement liée au contrôle du transfert placentaire du glucose et à la régulation de la glycémie foetale (KELLY & coll., 1974 ; POSNER, 1977). On ne connaît pas le mode de régulation de ces sites récepteurs.

Puisque l'OCS fait sécréter des somatomédines par le foie (HURLEY & coll., 1977) l'IGF (Insulin - like Growth Factor, VAN WYK & coll., 1974), peut participer également au contrôle de la glycémie et des anabolismes maternels et foetaux. La somatomédine IGF est d'ailleurs aussi puissante que l'insuline sur la pénétration du glucose dans le muscle. Elle agit au niveau de sites récepteurs propres. Par contre, elle est beaucoup moins active que l'insuline sur la cellule adipeuse (FROESCH & coll., 1976).

La fructosémie foetale est trois à quatre fois plus élevée que la glycémie foetale chez les Ruminants (TSOULOS & coll., 1971). Néanmoins le fructose n'est pas un précurseur important du glucose.

En effet, l'injection de fructose marqué à des foetus d'Agneau ne conduit pas à l'apparition de taux significatifs de radioactivité dans le glucose ou le lactate et le taux de clearance du fructose reste extrêmement bas (ALEXANDER & coll., 1970). Le fructose est d'origine placentaire et peut être toutefois exceptionnellement métabolisé en fructose 6P par la fructokinase lorsque la glycémie foetale chute, notamment à la suite de jeûne prolongé de la mère (BASSETT & MADILL, 1974). La phosphofructokinase qui transforme le fructose 6P en fructose 1,6 diP est d'ailleurs une enzyme adaptative sensible au jeûne et à l'insuline (BALLARD, 1972 ; OREVI & coll., 1972).

Le lactate est une source énergétique importante chez le foetus de Ruminants (BATTAGLIA & MESCHIA, 1978). Il provient du glucose maternel et est formé dans le placenta. Sa synthèse dépend de l'activation d'enzymes de la glycolyse insulino-dépendantes (hexokinase, phosphofructokinase et pyruvatedéshydrogénase) (ROUS, 1977 a).

La consommation du glucose varie selon les organes.

Le cerveau du foetus est un consommateur strict de glucose comme celui de l'adulte. En revanche, le coeur du foetus de Ruminant consomme à la fois du glucose et du lactate alors que chez l'adulte les acides gras jouent un rôle énergétique prédominant pour cet organe (WARSHAW, 1961). La croissance des tissus foetaux qui correspond à une consommation énergétique d'environ 90 Kcal par jour et par Kg chez un foetus d'Agneau âgé de 130 jours, (ABRAMS & coll., 1969) tire donc essentiellement son énergie du glucose maternel, ce qui favorise une fuite non négligeable de ce glucose qui prédispose, surtout lors de gestations multiples à l'apparition de cétose chez la mère (toxémie de gestation de la Brebis). Bien que la consommation énergétique du foetus soit en définitive assez faible, le fait qu'elle dépende presque exclusivement du glucose maternel qui est déjà à des concentrations sanguines faibles chez les Ruminants à l'état normal, est un facteur limitant pour l'estérification des acides gras dans les cellules adipeuses, et par suite favorable à la production de corps cétoniques par le foie, comme nous le discuterons plus loin.

II) METABOLISME LIPIDIQUE ET oCS

Dans l'espèce humaine, l'hCS augmente considérablement la mobilisation des graisses de réserves de la mère (GRUMBACH & coll., 1968 ; BURT, 1968). Il en est de même pour l'hGH. Chez la Brebis (MANN & BODA, 1965 ; VEZINHET & coll., 1974) comme chez la Vache (WILLIAMS & coll., 1963), l'hormone de croissance provoque l'élévation du taux des acides gras libres du sang après un jeûne prolongé. Contrairement aux résultats préliminaires d'HANDWERGER & coll., (1976), il paraîtrait raisonnable de considérer que l'oCS présente la même activité lipolytique que l'hCS, l'oGH, la bGH et l'hGH. D'ailleurs, les récepteurs à l'oCS sont abondants sur les adipocytes (CHAN & coll., 1978).

La forte activité somatotrope de l'oCS sérique maternelle pourrait donc expliquer l'augmentation progressive des acides gras libres sanguins à partir du 100ème jour de gestation (BLOM & coll., 1976). Comme les taux sériques d'oCS, ces concentrations d'AGL sont proportionnelles au nombre de foetus (MARTAL & DJIANE, 1977 a, P₁₄ x ; THIMONIER & coll., 1977, P₂₀, Chapitre VII). Cette élévation d'AGL pourrait donc constituer une cause prédisposante de la toxémie de gestation de la Brebis.

Chez le foetus d'Agneau la quantité d'acides gras libres et de corps cétoniques est particulièrement faible (BATTAGLIA & MESCHIA, 1978) bien qu'elle soit élevée chez la mère.

Le rôle de l'oCS dans le métabolisme lipidique foetal paraît donc de peu d'importance. D'ailleurs le tissu adipeux d'un foetus d'Agneau ne correspond qu'à environ 2 % du poids du corps à la naissance (RATTRAY & coll., 1974), alors que celui d'un enfant nouveau-né est de 16 % (WIDDOWSON, 1950).

Le mode d'action de l'oCS sur le métabolisme lipidique peut être complexe si l'on se réfère à celui de l'hCS. En effet, chez le Rat, cette hormone possède, d'une part, une puissante activité lipolytique in vitro, supérieure à celle de l'ACTH et de l'hormone de croissance (GENAZZANI & coll., 1969) et, d'autre part, une activité lipogénique chez l'animal bien nourri en stimulant la synthèse de graisses, in vitro (FELBER & coll., 1972).

Cette dualité d'effets opposés est tout à fait originale car toutes les autres hormones qui agissent sur le métabolisme des lipides sont soit lipolytiques (glucagon, adrénaline, ACTH, thyroxine, glucocorticoïdes, hormone de croissance hypophysaire, hormone β lipotrophique), soit lipogéniques (insuline, IGF, oestrogènes).

Certaines hormones lipolytiques (adrénaline, glucagon, ACTH) augmentent essentiellement l'activité adénylatecyclase membranaire de la cellule adipeuse, et, par suite, l'AMP cyclique qui active la lipase hormonodépendante. La thyroxine potentialise l'action de ces hormones. Les glucocorticoïdes et l'hormone de croissance augmentent, par contre, la synthèse de l'adénylatecyclase (ROUS, 1977 a). Le mode d'action précis de l'hCS est encore ignoré, par contre, l'activité lipogénique de l'insuline est assez bien connue : cette hormone favorise la synthèse du précurseur des acides gras, l'acétylCoA, soit à partir du glucose, soit surtout chez les Ruminants, à partir de l'acétate, en augmentant la synthèse et l'activité de l'acétylCoA synthétase et en induisant la synthèse de la synthétase d'acides gras (ALBERTS & coll., 1977 b).

Le mécanisme antilipolytique de l'insuline est en revanche encore mal connu et controversé (CLAUSER, communication personnelle). Certains pensent qu'elle stimule essentiellement la phosphodiesterase membranaire qui dégrade l'AMP cyclique (LOTEN & SNEYD, 1970).

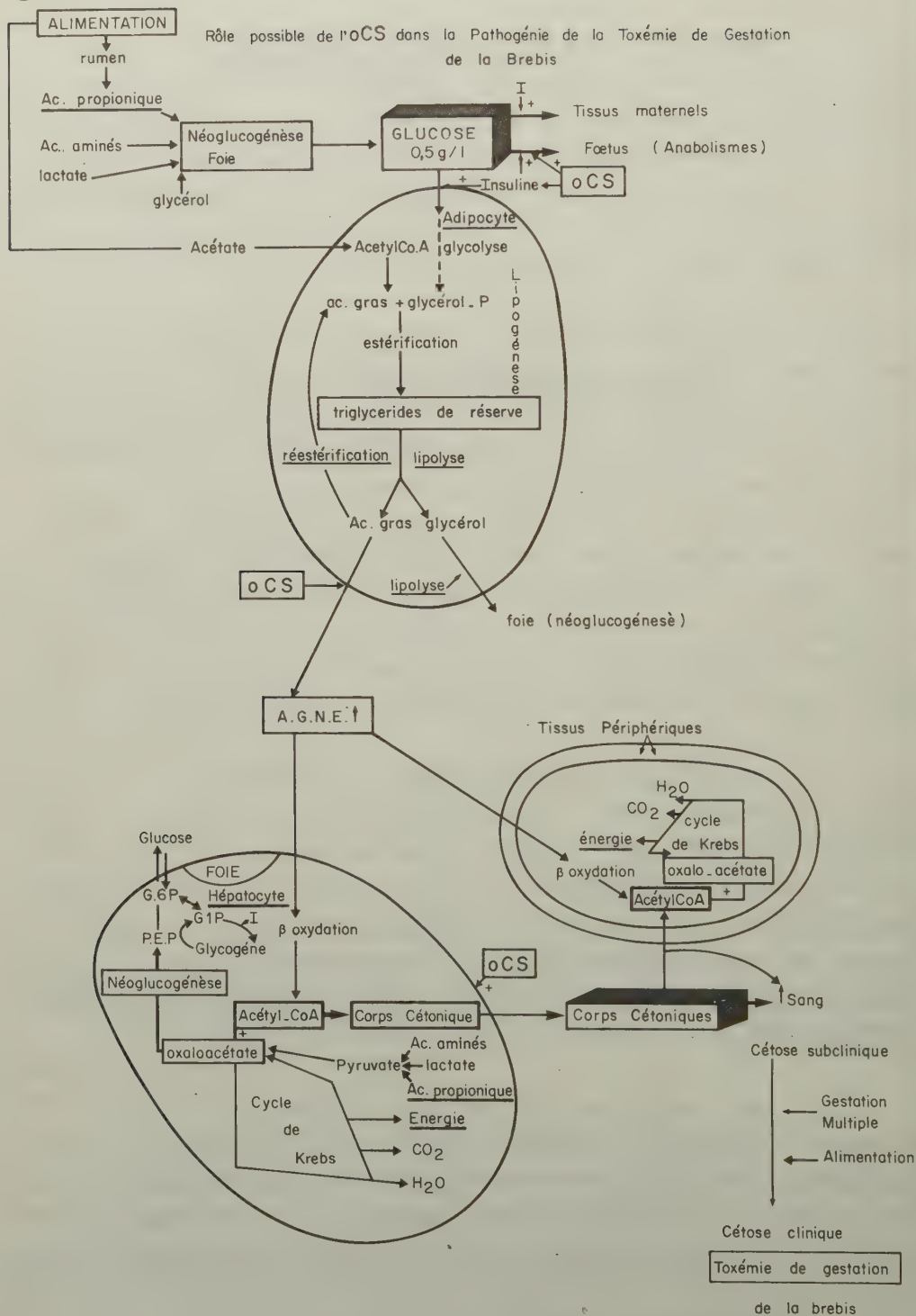
III) OCS ET PATHOGENIE DE LA TOXEMIE DE GESTATION DE LA BREBIS

La toxémie de gestation de la Brebis, caractérisée par une importante acétonémie, survient essentiellement chez des brebis à gestation multiple dont les pertes glucidiques ont été considérables lors de l'édification des foetus et dont la supplémentation alimentaire est restée insuffisante. Elle apparaît surtout en fin de gestation lorsque le poids des foetus est très augmenté.

Les hormones de la lipolyse, et surtout, très probablement, l'hormone lactogène placentaire dont la sécrétion est proportionnelle au nombre de foetus chez la Brebis (Chapitre VII) pourraient provoquer l'augmentation des acides gras libres formés par les cellules adipeuses, et une synthèse secondaire accrue des corps cétoniques par le foie. D'ailleurs, l'hormone de croissance hypophysaire augmente la production des corps cétoniques par cet organe (JACQUOT & coll., 1960). L'OCS dont l'activité somatotrope circulante est beaucoup plus élevée et dont les récepteurs hépatiques sont abondants, pourrait posséder la même fonction.

Du point de vue biochimique (LEHNINGER, 1977), la cétose ou apparition de corps cétoniques dans le sang correspond à un syndrome d'étiologies diverses mais de pathogénies presque identiques. Lors du jeûne, du diabète sucré ou des cétooses de Ruminants (toxémie de gestation, acétonémie de la Vache laitière) le taux sanguin des corps cétoniques, qui normalement est bas, peut atteindre des niveaux très élevés.

Les conditions de cétose clinique se réalisent lorsque la formation des corps cétoniques (acide hydroxybutyrique, acide acéto-acétique, acétone) par le foie dépasse la capacité d'utilisation de ceux-ci par les tissus périphériques, ce qui entraîne la formation d'acétylCoA directement utilisable lors du cycle de Krebs comme source d'énergie pour les métabolismes cellulaires.



Lorsque la pénétration cellulaire du glucose vient à diminuer considérablement avec excès de glucose sanguin lors du diabète sucré chez les Monogastriques ou par hypoglycémie lors de jeûne prolongé ou lors de consommations de glucose tissulaire importantes lors de gestation (toxémie de gestation de la Brebis, acétonémie puerpérale de la Vache) ou de la lactation (acétonémie de la Vache laitière), la dégradation des lipides est augmentée par les hormones de la lipolyse afin de fournir à l'organisme une source d'énergie de remplacement.

Le produit terminal de l'oxydation des acides gras est constitué par la formation de molécules d'acétyl-CoA dans le foie. L'insuffisance du glucose cellulaire limite la réutilisation de cet acétylCoA par la cellule adipéuse elle-même lors de la réestérification des acides gras, car le glycérol-phosphate nécessaire à la synthèse des triglycérides résulte de la dégradation du glucose qui est devenu limitant. L'activation de la lipolyse et la limitation de la réestérification conduisent à un surplus cellulaire d'acides gras non estérifiés qui sont acheminés vers le foie et partiellement oxydés en corps cétoniques.

De plus, l'insuffisance cellulaire en glucose favorise la néoglucogénèse dans le foie à partir de l'acide propionique, des acides aminés et du lactate.

Cette néoglucogénèse passe par l'utilisation de l'oxaloacétate qui est également nécessaire à la dégradation de l'acétylCoA dans le cycle de Krebs. L'acétylCoA est alors dévié vers la formation de corps cétoniques par le foie.

L'insuffisance de glucose cellulaire favorise donc la formation de corps cétoniques, d'une part, à cause de la diminution de la réestérification des acides gras par manque de glycérol-P et, d'autre part, à cause de l'utilisation de l'oxaloacétate dans la néoglucogénèse ce qui limite la dégradation de l'acétylCoA et favorise alors la formation de corps cétoniques.

Au bout d'un certain temps, l'état de cétose sub-clinique si fréquent chez les Ruminants se transforme en cétose clinique si l'alimentation n'est pas corrigée en augmentant l'apport des précurseurs du glucose : le lactate, les aminoacides et surtout l'acide propionique chez les Ruminants. La synthèse de cet acide gras par les bactéries du rumen est favorisée par les régimes riches en herbe verte et en graminées, et considérablement diminuée au profit de l'acide acétique dans les régimes riches en cellulose (paille, foin) et au profit de l'acide butyrique dans les régimes à base d'ensilages. Un traitement par les glucocorticoïdes qui favorise la synthèse du glucose par néoglucogénèse à partir des acides aminés diminue donc la formation des corps cétoniques en augmentant la synthèse de glycérol-phosphate et par suite la réestérification des acides gras.

Les fig 89 et 90 résument le rôle probable de l'oCS dans la toxémie de gestation de la Brebis et de la bCS dans l'acétonémie puerpérale de la Vache (MARTAL, 1978, C22, 1979, P₂₅ x).

L'oCS et la bCS favoriseraient donc la formation de corps cétoniques d'une part en provoquant une importante perte de glucose lors de la croissance pondérale des foetus, et d'autre part, en stimulant la lipolyse et la synthèse de corps cétoniques.

La différence fondamentale entre ces deux maladies provient essentiellement du facteur déclenchant : le nombre et le poids des foetus dans la toxémie de gestation, la fuite de glucose sous forme de lactose lors de l'acétonémie de la Vache laitière.

IV) ANABOLISME PROTEIQUE ET oCS

L'administration d'hormone lactogène placentaire ovine à des brebis provoque, d'une part, une hyperinsulinémie et, d'autre part, une hypoaminoacidémie (HANDWERGER & coll., 1976) (Fig 88). On sait depuis longtemps que l'insuline favorise la pénétration cellulaire des aminoacides (IUCK & coll., 1928). Néanmoins, dans ces expériences, l'oCS à faible dose provoque également une baisse de l'acidoaminoacidémie sans variation de l'insulinémie, ce qui suggère un rôle propre de l'oCS sur le transport des aminoacides. De même, l'hormone de croissance abaisse l'acidoaminoacidémie chez la Brebis (MANNES & BODA, 1965) sans affecter ni la glycémie ni l'insulinémie. L'oCS et l'hormone de croissance ovine entrent en compétition vis-à-vis des mêmes sites récepteurs de croissance (KELLY & coll., 1976 ; MARTAL & DJIANE, 1977 b, MARTAL, 1978 a) bien que la liaison de ces deux hormones ne paraisse pas rigoureusement identique (CHAN & coll., 1978). L'hormone de croissance bovine, ajoutée in vitro à des diaphragmes de rats hypophysectomisés, augmente, d'une part, la pénétration des aminoacides dans les cellules, et, d'autre part, leur incorporation dans les protéines (KOSTYO, 1964). L'hormone lactogène placentaire humaine augmente également la synthèse des polyribosomes et stimule la synthèse des protéines musculaires (FIORINI & coll., 1966). Nous verrons, dans le Chapitre X, que l'oCS stimule la synthèse protéique dans la glande mammaire.

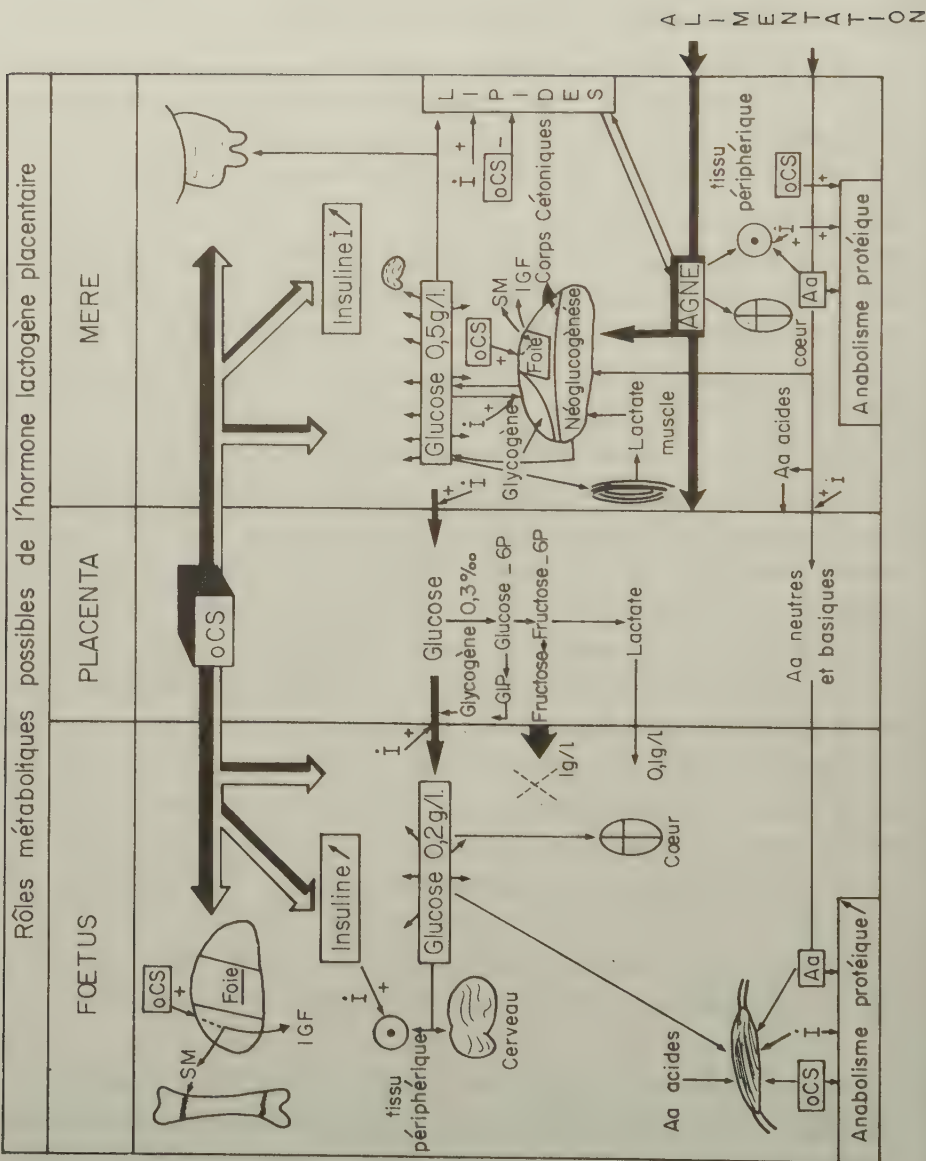
Par ailleurs, les femelles gestantes sont douées de grandes facultés anabolisantes qui leur permettent de retenir au cours de la gestation beaucoup plus d'azote protéique que n'en exige la construction du fœtus et de ses annexes. Ces facultés anabolisantes sont les mêmes chez la Ratte gestante et chez la Ratte privée de fœtus mais ayant conservée les placentas. En revanche, si l'on enlève à la fois fœtus et placentas, l'anabolisme de gestation cesse aussitôt et le bilan azoté revient rapidement à l'équilibre (ROMBAUTS & coll., 1956 ; BOURDEL & JACQUOT, 1959 ; SUSBIELLE & coll., 1969). L'administration de prolactine à forte dose reproduit cette rétention azotée (BOURDEL & JACQUOT, 1959).

Chez la Brebis, l'anabolisme de gestation a été démontré en étudiant les variations de la composition azotée de la carcasse (ROMBAUTS, 1959 a).

L'anabolisme protéique est toujours très supérieur aux besoins stricts de la gestation. Ainsi, les gains réalisés par la mère correspondent à la moitié environ des rétentions azotées totales (mère + fœtus + enveloppes). Ces gains de protéines profitent, par ordre d'importance, à la glande mammaire, au foie, aux reins, et à la plupart des muscles (ROMBAUTS, 1959 b). Il est intéressant de noter que les gains maternels de la Vache sont plus faibles que ceux de la Brebis et que les concentrations plasmatiques de bCS sont également inférieures à celles de l'oCS. L'intérêt de l'anabolisme maternel de gestation peut résider dans une sorte de sécurité nutritionnelle pour le fœtus si l'alimentation maternelle venait tout à coup à être insuffisante, dans la constitution d'une réserve pour les besoins nutritionnels de la lactation, dans l'édification du tissu mammaire nécessaire à la lactation et dans la garantie de réserves contre l'épuisement dû à une lactation prolongée pendant toute la durée de la gestation. Chez la Brebis, nous avons vu que lorsque l'on provoque expérimentalement une lactation un mois avant la parturition, le poids du fœtus est nettement diminué, d'environ un kg : $2,8 \pm 0,4$ kg ($n = 12$) contre $3,9 \pm 0,5$ kg ($n = 30$) (Chapitre VIII). Il en résulte, dans cette espèce, que la lactation n'est effectivement pas compatible avec une gestation normale.

Enfin, l'action probable de l'hormone lactogène placentaire ovine sur l'anabolisme protéique maternel et foetal pourrait être, d'une part, directe, comme c'est le cas de l'hormone de croissance et de l'hPL et, d'autre part, indirecte, en augmentant l'insulinémie et par suite

Rôles métaboliques possibles de l'hormone lactogène placentaire



l'anabolisme protéique. Comme nous l'avons signalé ci-dessus, la croissance pondérale du foetus paraît, d'une part, proportionnelle à l'insulinémie foetale et, d'autre part, à l'activité de croissance circulante et notamment à l'hormone lactogène placentaire (GIRARD & coll., 1979 ; MARTAL, 1978).

Tous les aminoacides ne traversent pas la barrière placentaire : si les aminoacides neutres et basiques proviennent de la mère, les acides aminés acides sont directement synthétisés par le foetus d'Agneau, d'après les expériences de bilans artérioveineux au niveau de la circulation ombilicale (LEMONS & coll., 1976). Ces résultats suggèrent une déficience du système membranaire de transport des acides aminés acides (DAHL & HOFIN, 1974), dans le placenta des Ruminants.

L'ensemble des rôles métaboliques possibles de l'oCS est résumé fig 91.

En conclusion, il est probable que l'oCS est comme l'hCS une importante hormone métabolique de gestation. Elle semble impliquée dans les métabolismes glucidique, lipidique, et protéique. Elle paraît pouvoir jouer un rôle favorisant dans l'anabolisme de gestation et, lors d'hyper-sécrétion due à la multiplicité des foetus, dans la prédisposition à la toxémie de gestation de la Brebis. Néanmoins, des études expérimentales approfondies demeurent nécessaires pour tester les hypothèses suggérées au cours de ce chapitre.

CHAPITRE X

oCS et glande mammaire

Au cours de la vie foetale, la glande mammaire se différencie et son système canaliculaire se développe. Après la naissance, la croissance mammaire est isométrique jusqu'à la puberté, puis devient allométrique. Cette dernière varie toutefois considérablement selon les espèces. Le système canaliculaire est alors enveloppé dans un tissu adipeux très abondant.

Au cours de la première gestation, des bourgeons se forment à l'extrémité des canaux mammaires, puis le système lobuloalvéolaire envahit le tissu adipeux qui régresse. Chez la Brebis primipare, la croissance mammaire correspond à environ 80 % de la croissance maximale. Cette mammogénèse est quantifiable par la détermination du contenu mammaire en ADN qui est directement proportionnel au nombre de cellules mammaires (DENAMUR, 1964). Ces transformations morphologiques sont chronologiquement contrôlées par des équilibres endocriniens que nous discuterons dans ce chapitre.

L'apparition de l'activité sécrétoire des cellules épithéliales mammaires, ou lactogénèse, est caractérisée par une synthèse très importante des ARN totaux, par la synthèse spécifique d'un sucre, le lactose, et par celle de protéines sécrétoires : caséines, α lactalbumine et β lactoglobuline. Les activités enzymatiques du tissu mammaire augmentent également, notamment celles de la lactosynthétase constituée par l'association galactosyltransférase - α lactalbumine. Lorsque la sécrétion lactée devient évidente à l'oeil nu, nous parlons de montée laiteuse.

Les équilibres endocriniens contrôlant l'induction des phénomènes sécrétoires étant différents de ceux qui contrôlent la montée laiteuse, nous réservons, à la différence des Anglo-Saxons, le terme de lactogénèse aux phénomènes d'initiation de la sécrétion lactée.

Enfin, nous ne traiterons pas ici de la régulation endocrinienne de la galactopoïèse (entretien de la lactation), bien qu'elle ait fait l'objet de plusieurs publications (MARTAL, 1973, P5., MARTAL, 1975, P6, P7.

Chez la Brebis, la mammogénèse débute entre le 95ème et le 100ème jour de gestation (DENAMUR, 1964) et la lactogénèse est décelable dès le 100ème jour.

A la différence de ce qu'on a cru pendant longtemps, mammogénèse et lactogénèse ne sont donc pas antagonistes, mais associées. A la fin de la gestation, la croissance de la glande mammaire est pratiquement terminée, puisque la quantité totale d'ADN représente alors 95 % de la quantité maximale. Ainsi, le contrôle endocrinien de la mammogénèse est particulièrement important pendant la gestation puisqu'il conditionne la future production laitière.

Nous étudierons donc le rôle de l'hormone lactogène placentaire ovine dans la mammogénèse et la lactogénèse de gestation. Nous essayerons de distinguer la participation respective de l'oCS et de la prolactine à ces fonctions physiologiques. Nous analyserons ensuite les mécanismes du contrôle de l'inhibition normale de la montée laiteuse au cours de la gestation de la Brebis.

MATERIEL ET METHODES

1. Animaux

Ils sont répartis en divers groupes correspondant à plusieurs expériences. Toutes les brebis sont de races Pré-alpes du Sud.

- Le premier groupe de brebis gestantes primipares sert à l'étude in vivo du rôle de l'oCS dans la mammogénèse et la lactogénèse de gestation.

Il comprend un lot de 40 brebis traitées par la bromocryptine, comme nous l'avons décrit au chapitre VII. Les injections commencent à partir du 70ème jour de gestation et se poursuivent jusqu'au moment de l'abattage qui a lieu à des stades variés de la gestation.

Un second lot de 52 brebis gestantes sert de témoin. A l'abattage des animaux, la glande mammaire est prélevée et congelée jusqu'au moment des dosages.

- Un deuxième groupe de brebis gestantes primipares sert à l'étude in vitro du rôle de l'oCS, d'une part, dans le développement lobuloalvéolaire du tissu mammaire, et, d'autre part, dans l'induction de la lactogénèse, (en collaboration avec Claude DELOUIS). Des fragments de tissu mammaire sont prélevés chirurgicalement, sous anesthésie générale, soit vers le 30ème jour de gestation, dans le premier cas, soit vers le 85ème jour, dans le second.

- Un troisième groupe de brebis gestantes sert à l'étude in vivo de l'induction expérimentale de la sécrétion lactée sous l'effet de l'oCS, l'action de la prolactine étant inhibée par la bromocryptine.

Le lot I comprend 6 brebis gestantes traitées par la bromocryptine jusqu'à la parturition, comme précédemment. De plus, chaque animal reçoit 25 mg de cortisol (hydrocortisone ROUSSEL), deux fois par jour, par voie intramusculaire, à partir du 119ème jour de gestation, jusqu'à la

mise bas.

Tous les animaux de ce lot, et des lots suivants, sont traités manuellement, deux fois par jour, à partir du 119ème jour, pendant toute la durée de l'expérience. Le lot II est composé de 6 brebis gestantes qui servent de témoins. Elles reçoivent du cortisol, mais pas de bromocryptine.

Le lot III est constitué de 3 brebis gestantes traitées par la bromocryptine comme le lot I, hystérectomisées le 127ème jour de gestation et traitées par le cortisol, 25 mg, deux fois par jour). Ce dernier traitement débute 48 heures après l'opération.

Le lot IV est composé de 5 brebis gestantes qui ne reçoivent que du sérum physiologique (NaCl 9 %).

Le lot V comprend des brebis gestantes traitées à la fois par la bromocryptine, le cortisol (50 mg par jour), et la progestérone (ROUSSEL, 100 mg par jour, par voie intramusculaire).

- Un quatrième groupe de brebis gestantes primipares est utilisé pour l'étude des mécanismes de régulation endocrinienne de l'expression des gènes des caséines, en collaboration avec Pierre GAYE.

Ce groupe est divisé en 8 lots d'au moins trois animaux chacun. Toutes les brebis sont traitées pendant les cinq jours qui précèdent l'abattage. Celui-ci, a lieu le 120ème jour de gestation. Au moment de l'abattage, les animaux sont traités après avoir reçu 1 UI d'ocytocine (SANDOZ). La glande mammaire est ensuite prélevée et la quantification des ARN messagers des caséines est réalisée le jour même. Tous les lots sont constitués de brebis hystérectomisées et ovariectomisées entre le 110ème et le 115ème jour de gestation par la technique décrite au chapitre VII.

Le lot I ne reçoit aucun traitement. Les brebis sont opérées le 115ème jour de gestation.

Le lot II reçoit du cortisol (50 mg par jour et par animal) injecté en deux fois par voie intramusculaire dès le jour de l'opération (115ème jour de gestation) jusqu'à

l'abattage.

Le lot III reçoit de la progestérone (100 mg par jour et par animal) injectée pendant 5 jours, en une fois par voie intramusculaire dès la veille de l'opération jusqu'à l'abattage.

Les lots IV à VIII sont traités par la bromocryptine (2 mg par jour) à partir du 70ème jour de gestation jusqu'à l'abattage. Le traitement est toutefois suspendu les 3ème et 4ème jour précédents l'abattage. Le lot IV reçoit seulement de la bromocryptine et est opéré le 115ème jour. Les lots V à VIII reçoivent du cortisol aux mêmes doses que précédemment mais selon une chronologie variable. Les injections du cortisol débutent pour le lot V le jour de l'opération ; pour le lot VI, 24 heures après ; pour les lots VII et VIII, respectivement 3 et 5 jours après. Dans ce schéma expérimental, les injections de cortisol débutent toujours 5 jours avant l'abattage.

- Un dernier groupe d'animaux, constitué de lapines pseudo-gestantes (saillies par un mâle vasectomisé) est utilisé comme donneur de tissu mammaire pour les études d'induction hormonale de lactogénèse, in vitro.

2. Les préparations d'hormone lactogène placentaire sont obtenues selon la méthode décrite au chapitre I.

3. Le dosage radiorécepteur de l'activité lactogène de l'OCS a été également décrit au chapitre I.

4. La technique de culture du tissu mammaire est réalisée par Claude DELOUIS. Des explants de tissu mammaire de Brebis ou de Lapine d'un volume de 0,5 à 1 mm³ sont disposés par séries de 10, sur des grilles métalliques de boîtes de Falcon, contenant environ 0,7 ml de milieu de culture. Celui-ci est composé de milieu 199 (Microbiological Associates) supplémenté en pénicilline (40 UI par ml), en insuline (5 µg par ml, ENDOPANCINE 24 UI par mg) et en aminoacides (40 ml de la solution concentrée 100 fois d'acides

aminés du milieu de base de EAGLE par litre de milieu 199). Dans le cas de cellules de tissu mammaire de Brebis, de l'acétate de sodium ($5,44\mu\text{g}$ par μl est ajouté). Le milieu est tamponné à pH 7,5 avec du bicarbonate de sodium (2,2 g par l). Il est oxygéné par le mélange $\text{O}_2 - \text{CO}_2$ dont les proportions sont de 95 - 5 % dans le cas de tissu mammaire de Lapine. Dans le cas de tissu mammaire de Brebis, le mélange $\text{O}_2 - \text{CO}_2 - \text{N}_2$ (57 %, 5 %, 38 %) est utilisé selon la technique de CANNATA et al. (1975). La température des cultures est maintenue à 37°C . Les hormones suivantes sont ajoutées au milieu d'incubation : oestradiol - 17β (VISTER), 30 pg par ml ; progestérone (ROUSSEL), 30 ng par ml, hydrocortisone (microfine ROUSSEL) $5\mu\text{g}$ par ml ; oCS ($5\mu\text{g}$ d'équivalent prolactine . PS7 par ml) ; prolactine ovine ($5\mu\text{g}$ par ml NIH PS9, 24 UI par mg) ; hormone somatotrope ovine, ($5\mu\text{g}$ par ml, NIH GHS9, 1 UI par mg).

5. Examen histologique (C. DELOUIS)

Les explants sont fixés dans du liquide de BOUIN-HOLLANDE. Les coupes (6μ) sont colorées par l'hématoxyline, l'éosine et le vert lumière.

6. Dosage des acides nucléiques de la glande mammaire de Brebis

Il est réalisé par Claude DELOUIS, selon la méthode mise au point par Robert DENAMUR (1965). La glande mammaire est décongelée, homogénéisée avec un appareil Ultra-Turrax (10 000 tours par mn, 20 s, 4°C) dans de l'acide trichloracétique (TCA) à 10 % (w/v, 4°C) puis centrifugé (1500 g, 10 mn, 4°C). Le surnageant contient le lactose et les nucléotides acidosolubles (MARTAL, 1970, p2).

Après 4 extractions au TCA (10 %), le culot protéique est neutralisé par du méthanol-acétate de sodium (M) puis dégraissé par l'alcool 95° pendant 15 mn et le méthanol

chloroforme (2v/1v) pendant 12 heures. Il est déshydraté à l'aide d'alcool 100° (3v) puis d'éther (2v). Le poids sec de l'extrait est estimé après lyophilisation.

Un aliquote de l'extrait sec est finement broyé dans un broyeur à billes. Une hydrolyse alcaline est effectuée selon la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER (1945) sur un gramme de matière sèche dégraissée (25ml de NaOH, 0,3N, 24 h à 37°C). L'hydrolysats est neutralisé par l'HCl puis précipité par du TCA (10%). Le surnageant contient les ribonucléotides des ARN. Après extraction du TCA par l'éther, les nucléotides sont chromatographiés sur une colonne, (1 x 8cm) de DOWEX 1, X8 (HCOO^- , 200 - 400 mesh). La quantité du mononucléotide CMP 2',3' est déterminée à 260nm et le contenu mammaire en ARN est calculé sachant que ce mononucléotide correspond à 29% de la quantité totale des ribonucléotides ARN (DENAMUR, 1965,1966).

Le pilot de l'hydrolysats contient l'ADN. Il est remis en suspension et hydrolysé par l'acide perchlorique (N) pendant 1 heure 15 à 100°C. Cette hydrolyse acide libère quantitativement les bases puriques de l'ADN qui sont chromatographiées sur une colonne (1 x 8 cm) d'AMBERLITE IR 120 (H^+). Les bases puriques sont éluées par des concentrations croissantes d'HCl. Les quantités d'adénine et de guanine sont estimées à 260nm par lecture de la densité optique (DENAMUR, 1966). Le contenu en ADN de l'extrait sec dégraissé est alors calculé et exprimé, comme l'ARN, en mg de phosphore nucléique.

7. Dosage des activités lactose synthétase (EC 2.4.1.22), et galactosyl transférase (EC2.4.1.22)

Il est réalisé par Claude DELOUIS, selon la méthode de FITZGERALD et coll., (1970) légèrement modifiée. Les fragments de tissu mammaire sont pesés, broyés et homogénéisés à 4°C dans un tampon Tris-HCl (20mM), pH 7,5, KCl (150mM) MgCl_2 (5mM) et EDTA (5mM). L'homogénat est centrifugé (10 mn, 4000g, 4°C) de façon à éliminer les débris cellulaires. Le volume du surnageant est mesuré et du Triton X100 est ajouté à la concentration finale de 0,5⁰/00.

Le milieu d'incubation nécessaire à la réaction enzymatique présente dans un volume de 200 μ l (extrait enzymatique compris) les concentrations finales suivantes : 50mM de tampon Tris-HCl, pH 7,5, 40mM de $MnCl_2$, 50mM de glucose (ou 4mM de Nacétylglucosamine), 2,5 mM d'ATP (inhibiteur de UDPGal hydrolases), 0,5g/l de sérumalbumine bovine, 0,1mM (environ 50.000 cpm) d'UDPGal- ^{14}C (25 mCi/mM).

La durée de la réaction est de 10 mn à 37°C, sous agitation. La réaction enzymatique est arrêtée à 0°C, en ajoutant un excès de lactose non radioactif (10 μ M). Le lactose (ou la Nacétyl lactosamine) radioactif synthétisé est isolé par chromatographie sur colonne de DOWEX 1, X8 (0,5 x 2cm, 200 - 400 mesh sous forme $HCOO^-$ équilibrée en présence de lactose 10mM. La colonne est éluée par 2ml de lactose 10mM. La radioactivité éluée correspondant au lactose - ^{14}C ou à la Nacétyl - lactosamine - ^{14}C diluée dans un mélange scintillant et mesurée dans un compteur PACKARD. Une incubation témoin ne contenant ni glucose, ni Nacétyl - glucosamine permet de mesurer l'hydrolysats de l'UDPGal survenant pendant la réaction. Cette valeur est soustraite de tous les résultats exprimés en picomoles de produit formé pendant 10 mn par mg de tissu frais.

8. Mise en évidence de la synthèse de caséine in vitro

Ce dernier test est encore pratiqué en routine, par C. DELOUIS. Il est réalisé selon une adaptation de la méthode de caractérisation de la synthèse d'ovalbumine par PALMITER et coll., (1972).

Après 5 ou 7 jours de culture, le milieu de 3 boîtes est éliminé par aspiration et remplacé par du milieu frais contenant des acides aminés marqués au - ^{14}C (hydrolysats d'algues).

A la fin d'une période de 18 heures de marquage de caséines synthétisées, les explants sont lavés dans du milieu 199 contenant tous les aminoacides non radioactifs,

puis pesés, broyés et homogénéisés dans un microbroyeur en verre avec du tampon phosphate de potassium 10mM pH 7,2, NaCl 0,14M, Triton X100 1%, désoxycholate de sodium (DOC) 0,2%.

L'homogénat est centrifugé 20 mn à 4000g et le volume du surnageant est mesuré.

Un aliquote de 100 μ l du surnageant 4000g est incubé 1 heure à 37°C (en présence de 100 μ l de tampon phosphate de potassium (10mM, pH 7,2, NaCl 0,14M, DOC 2%, Triton 0,5%, acides aminés non radioactifs à concentration 50 fois supérieure à celle des aminoacides marqués), 5 μ g de caséine α_S ovine non radioactive (correspondant à la quantité de caséine nécessaire pour se placer au point d'équivalence) et 100 μ l d'un immunosérum anti-caséine α_S . Les anticorps anti-caséine α_S sont préparés à partir de caséines α_S purifiées et injectées à des cobayes (GAYE et coll., 1973).

Afin de déterminer les précipitations aspécifiques, la même incubation est faite en présence de 5 μ g de sérum-albumine bovine (BSA) et 100 μ l d'immunosérum anti BSA. Après incubation, les échantillons sont déposés sur une couche de saccharose (0,8ml d'une solution à 220g/l dans le tampon phosphate de K, 10mM, pH 7,2, NaCl 0,14M, acides aminés non radioactifs, Triton 0,5%, DOC 0,5%) et centrifugés 20 mn à 2500g. La couche de saccharose retient les petites molécules alors que le complexe antigène - anticorps la traverse. Seule cette méthode permet de séparer sans contaminations appréciables de petites quantités d'immunoprécipités.

Le précipité est ensuite dissous dans 0,5ml de NaOH (N) et la radioactivité est mesurée au spectromètre PACKARD. Les résultats sont exprimés en cpm/10mg de tissu frais/18 h et comparés à l'incorporation des acides aminés -¹⁴C dans les protéines TCA précipitables du surnageant 4000g.

9. Quantification des ARN messagers des caséines

Elle est réalisée par Pierre GAYE (GAYE et coll., 1977).

- Isolement des Polysomes totaux

Le tissu mammaire est découpé en petits fragments et homogénéisé dans 3 volumes (w/v) du tampon suivant : Tris-HCl (25mM, pH 7,5), sucrose (0,25M), KCl (25mM), MgCl₂ (25mM), Dithiothréitol (2mM), EDTA (0,1mM, pH 7,4), Triton X100 (1%), héparine (1mg/ml). L'héparine et la forte concentration en MgCl₂ permettent d'inhiber les activités RNAsiques.

Après filtration sur gaze, l'homogénat est centrifugé 10 mn à 1500g. Le surnageant est ensuite déposé sur 12ml de sucrose (1,5M) dilué dans du tampon Tris-HCl (25mM pH 7,5) KCl (25mM), MgCl₂ (5mM), Dithiothréitol (2mM), EDTA (0,1mM) et les tubes sont centrifugés à 105000g pendant 20 heures à 4°C.

- Extraction des ARN polysomaux

Les culots de polysomes sont solubilisés dans le tampon suivant : Tris-HCl (50mM), pH 8, EDTA (10mM), NaCl (50mM), SDS (1%) et la solution est traitée par un égal volume d'un mélange phénol/CHCl₃/alcool isoamylique (50/49/1). Après centrifugation, la phase aqueuse est prélevée et la phase phénolique lavée avec 0,5 volume du tampon de solubilisation.

Les phases aqueuses sont ensuite combinées et ré-extraites par un égal volume d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (98/2) et les ARN sont précipités par addition de 2,5 volumes d'éthanol à 95°. Afin d'éliminer divers contaminants (fragments d'ADN, héparine...) qui peuvent inhiber les systèmes de traduction, les ARN polysomaux sont traités par du LiCl (2M),

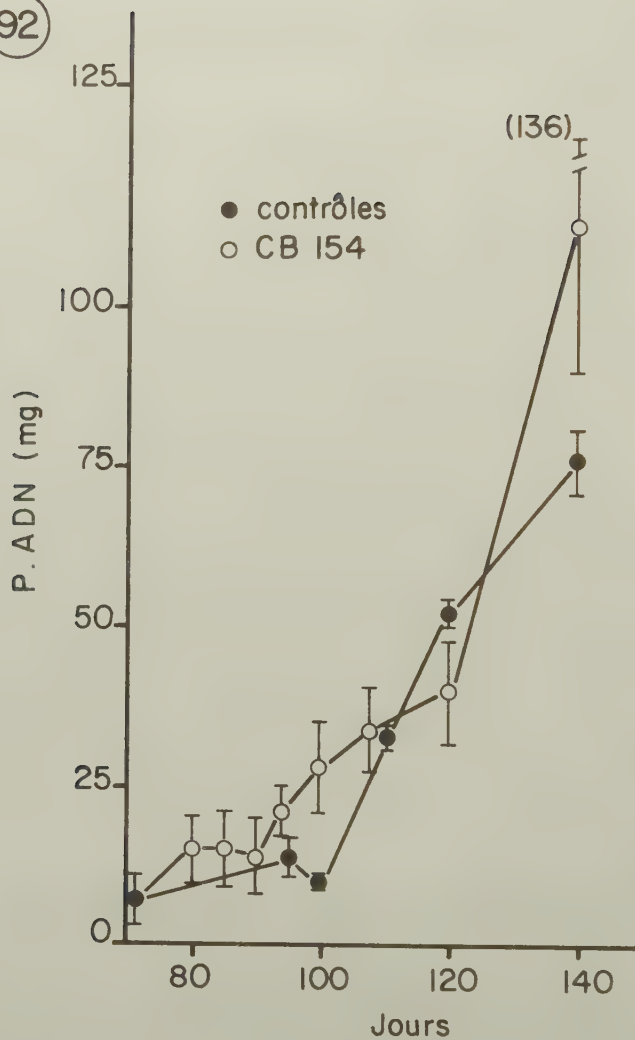
selon la méthode de PALMITER (1973).

- Méthode de détermination de l'activité messagère des ARN polysomaux

L'activité messagère des ARN est déterminée par traduction dans un lysat de germe de blé en présence de Leucine tritiée (40C/mM). Les ARN sont testés à la concentration de 5 à 25 $\mu\text{g/ml}$ dans un mélange réactionnel contenant par 100 μl : 25 μl de lysat de germe de blé S 23, 20mM Hepes pH 7,5, 100mM d'acétate de K, 20mM d'acétate de Mg, 300 μM de spermidine HCl, 1mM d'ATP, 0,2mM de GTP, 8mM de créatine phosphate, 5 μg de créatine Kinase et 20mM d'acides aminés non marqués. La Leucine- ^3H (CEA) est ajoutée à la concentration de 5 μM . Ce mélange de traduction est incubé 2 heures à 26°C. La quantité totale de Leucine incorporée dans les protéines est mesurée après précipitation de celles-ci par l'acide trichloracétique. La radioactivité incorporée dans les caséines α_{s1} , α_{s2} et β est déterminée après immunoprécipitation de ces protéines à l'aide d'anti-corps monospécifiques.

- Immunoprécipitation des caséines synthétisées in vitro

Une partie aliquote du mélange de traduction préalablement traitée par la RNase pancréatique et centrifugée (5 mn à 1500g), est incubée 60 mn à 37°C en présence de 5 μg d'antigène et de 100 μl d'anti-corps appropriés dans un tampon phosphate de sodium (10mM, pH 7,4), NaCl (150mM), Triton X100 (1%), Désoxycholate de sodium (0,5%) et Leucine (10mM). A la fin de l'incubation, le complexe antigène - anticorps est déposé sur un coussin de sucrose (1M) puis recueilli par centrifugation (5 mn, 1500g). Les immunoprécipités sont dissous dans 2,5ml de NaOH (0,1N) et la radioactivité est déterminée après addition d'un mélange scintillant.



Evolution de la composition en ADN des glandes mammaires durant la gestation chez des brebis traitées ou non par la bromocryptine (CB 154). (chaque point correspond à 4 animaux).

RESULTATS

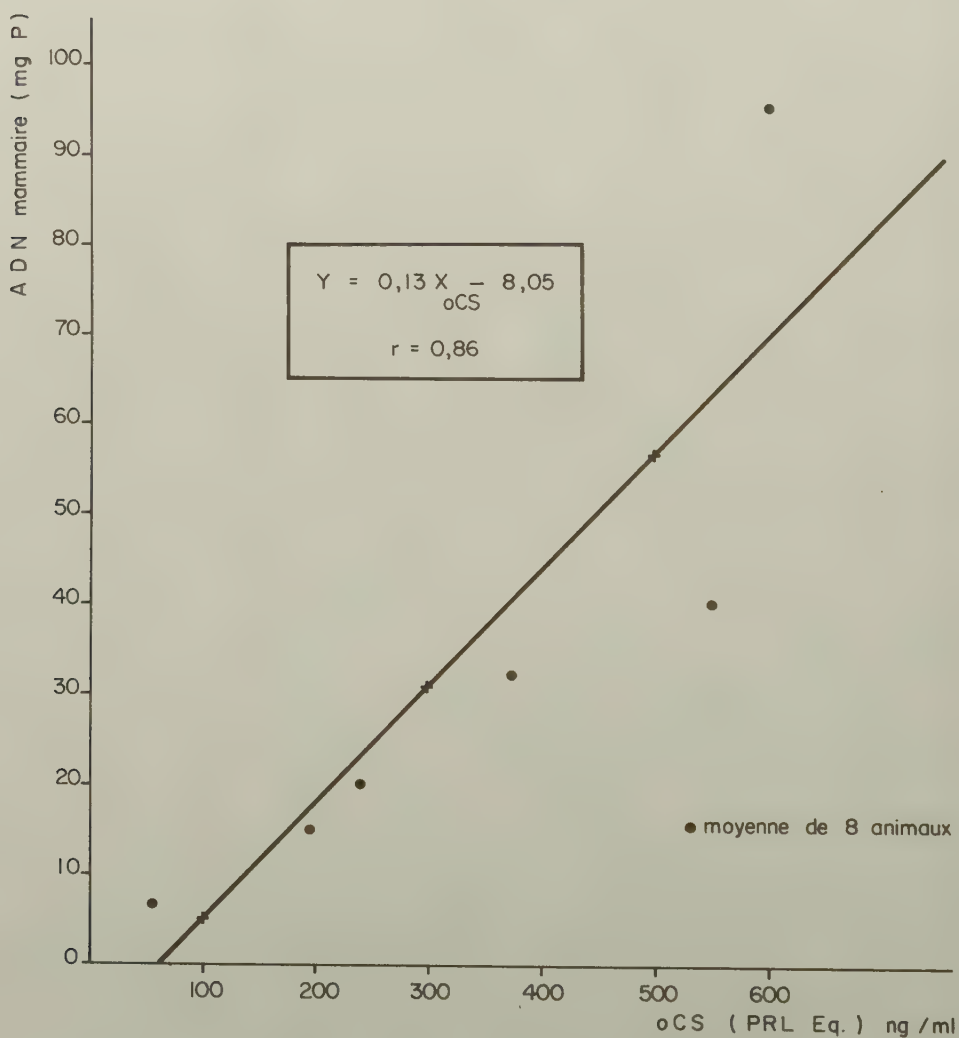
1. oCS et mammogénèse (non publié, DJIANE et coll., 1975, C 10x).

Les propriétés mammogènes de l'oCS ont été étudiées à la fois in vitro et in vivo.

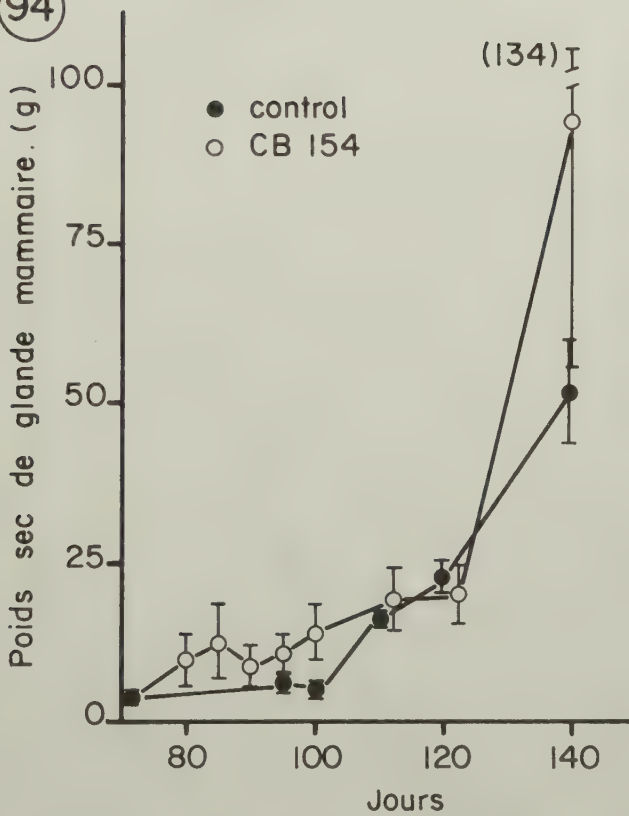
En culture organotypique de tissu mammaire, la présence d'insuline est toujours nécessaire à la bonne survie du tissu, quels que soient l'espèce et le stade gestatif considérés. L'examen histologique d'un fragment de tissu mammaire de Brebis, au 30ème jour de gestation, révèle des canaux mammaires peu ramifiés et des cellules épithéliales formant des épaississements à l'extrémité des canalicules. L'addition d'hydrocortisone à la culture d'explants mammaires permet la dilatation de la lumière des canaux mais ne provoque pas le développement lobuloalvéolaire de l'épithélium glandulaire. Pour que cette différenciation lobuloalvéolaire se produise en présence d'hormones lactogènes, il est nécessaire de faire précéder ce traitement par l'addition de stéroïdes ovariens pendant au moins deux jours (JEULIN-BAILLY et coll., 1973). Après deux jours d'action de l'oestradiol 17β et de la progestérone, ces hormones sont remplacées par de l'oCS associée pendant huit jours à de l'hydrocortisone et de l'insuline : un développement lobuloalvéolaire est obtenu comparable à celui observé, dans les mêmes conditions, avec de la prolactine et de l'hormone de croissance, (Fig. 101 B). Alors que les témoins sans E_2 - Pg ne présentent pas de développement lobuloalvéolaire, mais seulement quelques canaux dilatés, les acini sont très bien développés dans les explants stimulés par l'association E_2 - Pg - insuline - cortisol - oCS (2 jours) puis IC - oCS (8 jours), comme chez les témoins à E_2 - Pg - insuline - prolactine - GH - cortisol.

93

Régression linéaire entre le contenu en ADN des glandes mammaires
et la concentration sérique d'oCS maternelle chez la brebis.

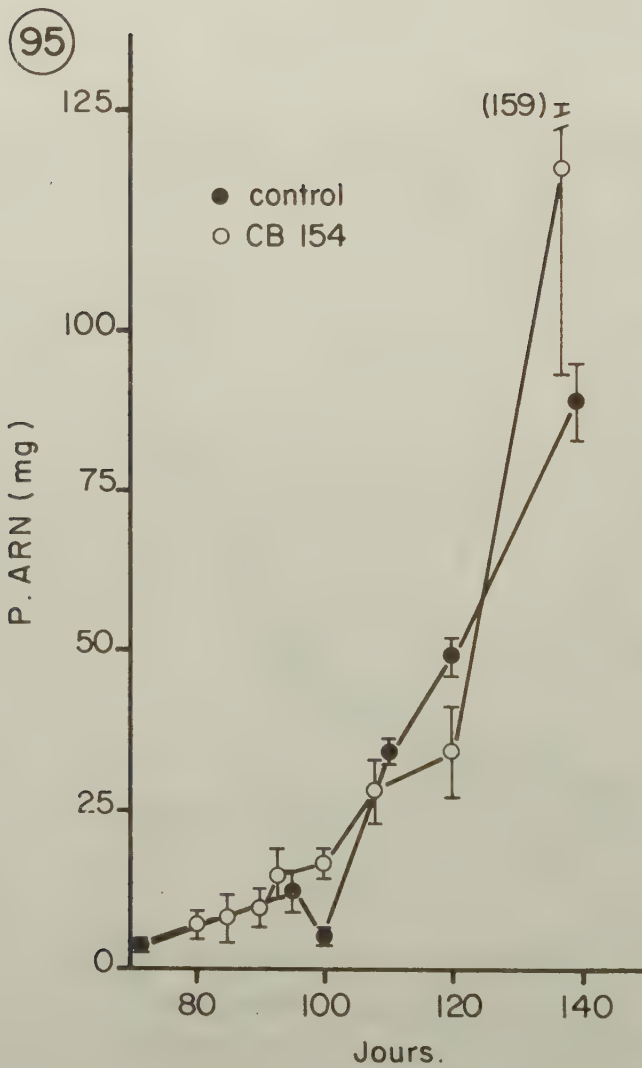


94



Evolution du poids sec de glande mammaire chez des brebis gestantes traitées ou non par la bromocryptine (CB 154).

(chaque point correspond à 4 animaux).



Evolution du contenu mammaire
en ARN totaux chez des brebis
gestantes traitées ou non par la
bromocryptine.
(chaque point correspond à 4 animaux).

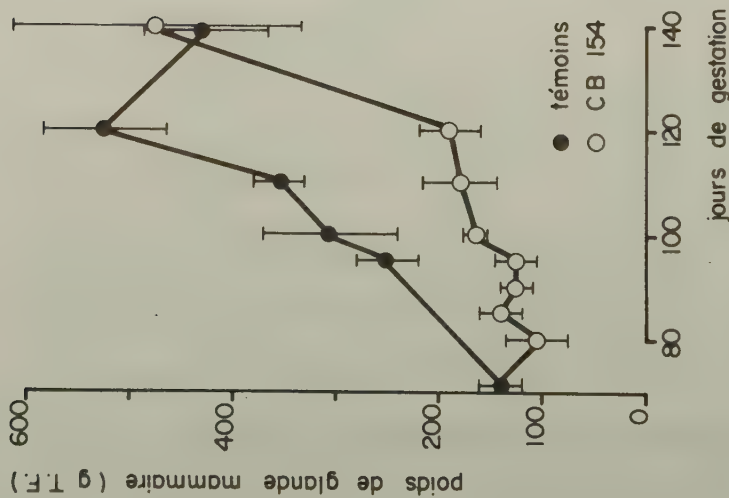
L'OCS présente donc, in vitro, un pouvoir mammo-gène identique à celui des hormones antéhypophysaires utilisées (PRL + GH).

L'activité mammo-gène de l'OCS a été également mise en évidence, in vivo, après traitement de brebis gestantes par la bromocryptine.

La Fig. 92 montre que l'évolution du contenu mammaire en ADN des brebis traitées (la moyenne de chaque point correspond à 4 animaux) est pratiquement identique à celle des animaux témoins, bien que la prolactine sérique ait été presque totalement supprimée par la bromocryptine, (Chapitre VII et VIII). L'importante production d'OCS, (Chapitre VII) semble donc suffire à une multiplication normale des cellules épithéliales mammaires. La Fig. 93 montre la proportionnalité entre ce contenu en ADN des glandes mammaires et la concentration sérique en OCS maternelle. Le poids sec de la glande mammaire s'accroît également de manière équivalente dans les deux lots de brebis (Fig. 94). L'évolution de la quantité d'Acide Désoxyribonucléique dans la glande mammaire de Brebis indique que la croissance mammaire est très peu accusée pendant les 100 premiers jours de gestation, alors qu'elle s'accélère considérablement durant le dernier tiers de la gestation (DENAMUR, 1964). Nous avons vu dans le chapitre VII que la production d'OCS augmente précisément beaucoup pendant cette dernière période.

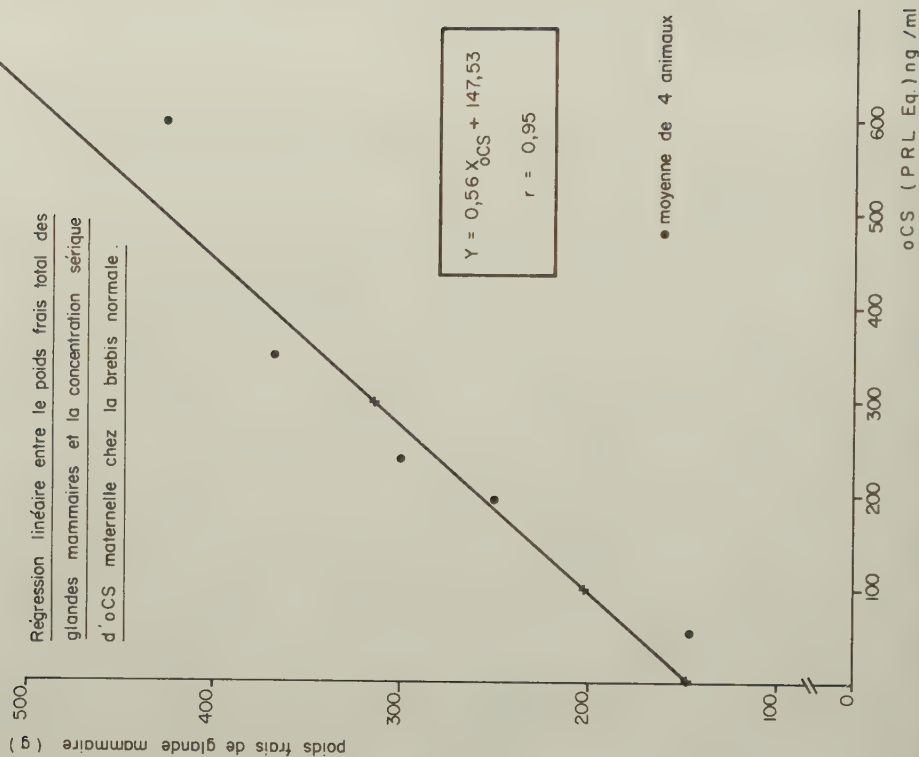
La Fig. 95 montre que l'évolution des Acides Ribonucléiques totaux n'est pas significativement différente entre les brebis traitées par la bromocryptine et les brebis gestantes normales. L'important accroissement des ARN totaux à partir du dernier tiers de la gestation signe essentiellement une hyperplasie cellulaire révélatrice d'importantes synthèses protéiques, notamment au niveau des protéines de structure. La présence d'OCS est donc suffisante pour assurer l'hyperplasie cellulaire en absence de prolactine. Soulignons toutefois que si l'évolution des ARN totaux est sensiblement identique à celle de l'ADN, elle ne correspond qu'à environ 50 % de l'ac-

96



Variations comparées du poids frais de glande mammaire chez des brebis gestantes traitées ou non par la bromocryptine.
(chaque point correspond à 4 animaux).

97



croissement maximal atteint pendant la lactation (DENAMUR, 1964).

Mais, si l'on compare (Fig. 96) le poids frais du tissu mammaire dans les deux groupes d'animaux, on observe que celui-ci est nettement plus faible chez les brebis gestantes traitées par la bromocryptine.

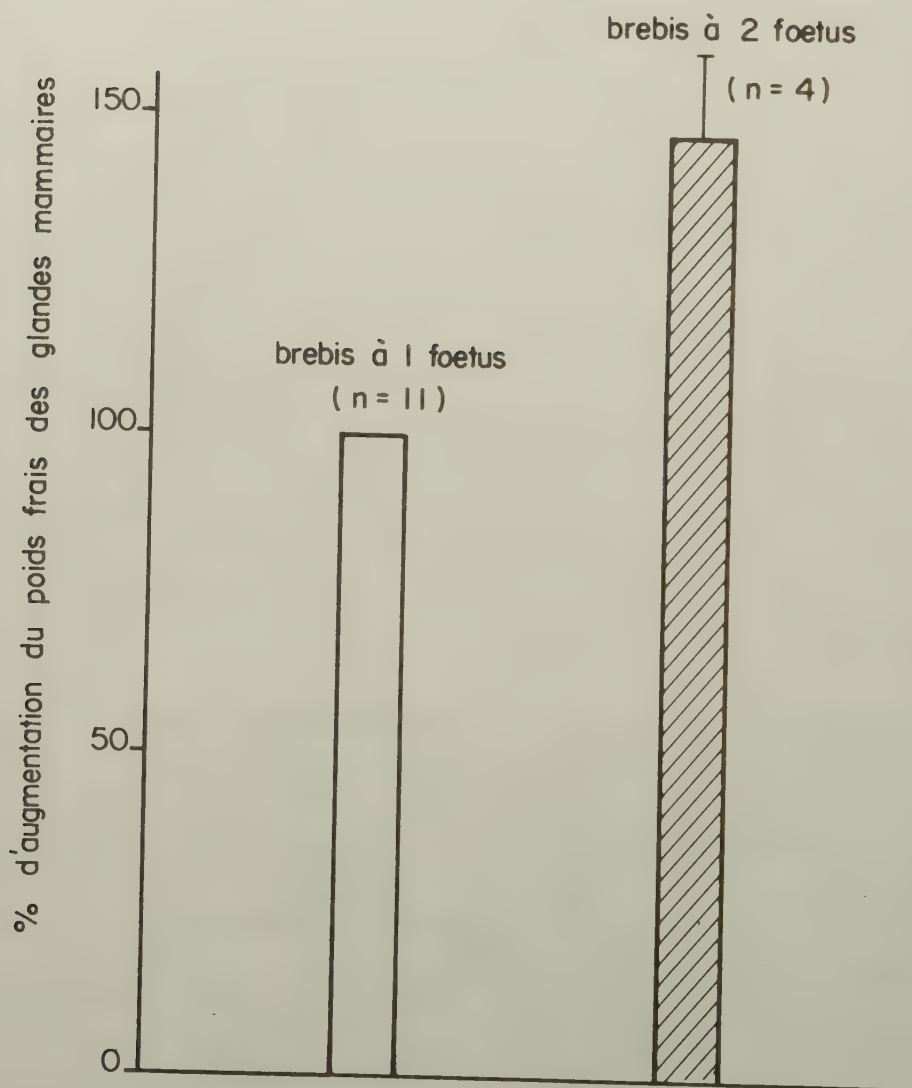
Ces résultats importants suggèrent que la prolactine hypophysaire pourrait présenter un rôle tout à fait particulier par rapport à l'oCS dans le métabolisme hydrominéral de la glande mammaire. Cette différence d'action entre ces deux hormones semble curieusement disparaître à la fin de la gestation, vers le 140^{ème} jour. Néanmoins, chez la brebis normale, la corrélation entre le poids frais de la glande mammaire et la concentration sérique d'oCS maternelle est élevée ($r=0,95$) (Fig.97). Enfin, chez les brebis hypoprolactinémiques, si l'on compare le poids frais des glandes mammaires des brebis à un et deux foetus, l'on observe une augmentation de $47 \pm 18\%$ ($n=4$), dans le cas de gémellité (Fig.98). Nous avons montré au chapitre VII la proportionnalité entre la sécrétion d'oCS et le nombre de foetus. Ces résultats sont donc en accord avec un rôle important de l'oCS dans la mammogénèse.

2. oCS et lactogénèse de gestation (non publié, MARTAL et coll., 1975, C 9x, C 11).

In vitro, en culture organotypique de glande mammaire de Lapine et de Brebis, l'activité lactogène de l'oCS a été mesurée par la synthèse du lactose et des caséines immunoprécipitables. La Fig. 99 montre chez la Lapine pseudogestante que l'oCS stimule les activités enzymatiques de la lactose synthétase et de la galactosyltransférase. L'activité enzymatique de la lactose synthétase est plus faible, probablement en raison de la quantité limitante d' α - lactalbumine dans les explants mammaires utilisés. Bien que l'activité enzymatique de la galactosyltransférase ne soit pas spécifique du tissu mammaire, elle est néanmoins dépendante de l'oCS ou de la prolactine dans ce tissu. La Fig. 100 montre que l'oCS est capable d'induire la synthèse des protéines spécifiques du lait. A l'examen histologique, Fig. 101 A, l'acti-

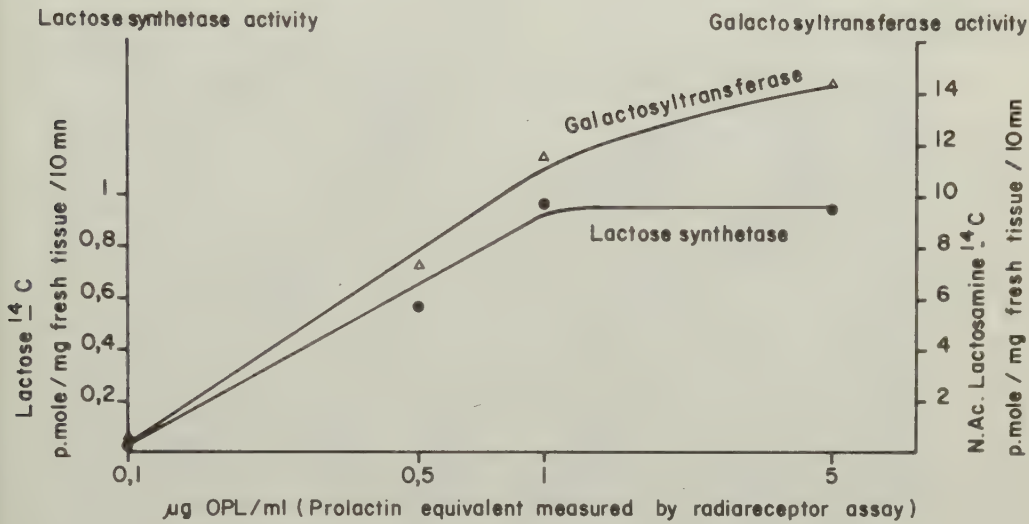
98

Comparaison entre 90 et 140 jours des glandes
mammaires de brebis à un ou deux foetus après
traitement par la bromocryptine.



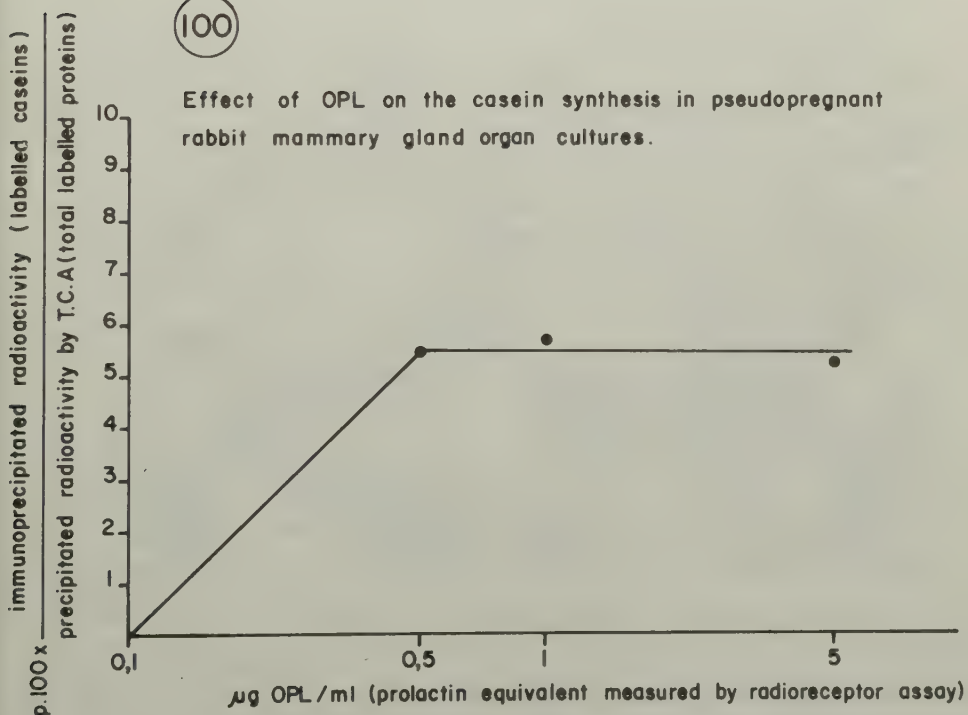
99

Lactogenic activity of OPL in pseudopregnant rabbit mammary gland organ cultures



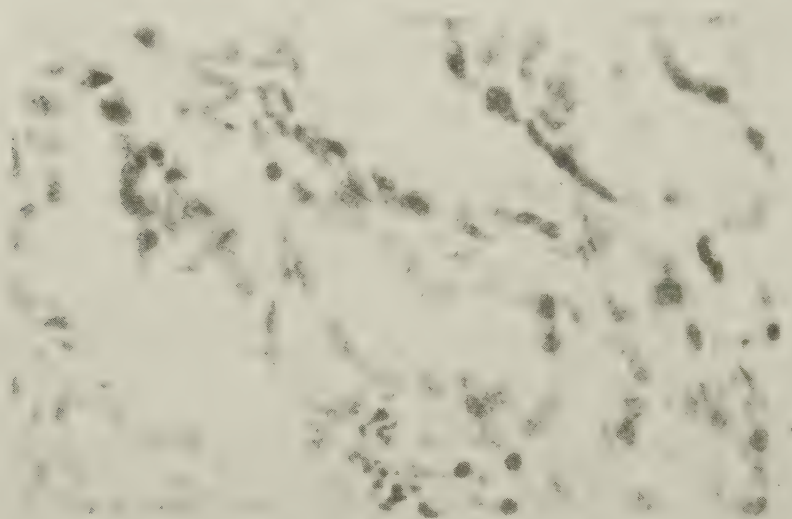
100

Effect of OPL on the casein synthesis in pseudopregnant rabbit mammary gland organ cultures.

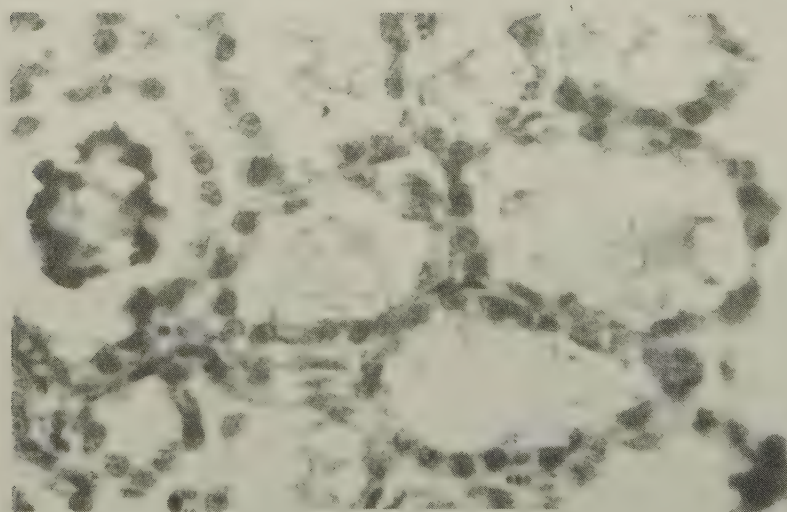


101a

CULTURE D'EXPLANT DE GLANDE MAMMAIRE DE LAPINE AU
12^e JOUR DE PSEUDOGESTATION



a) Insuline



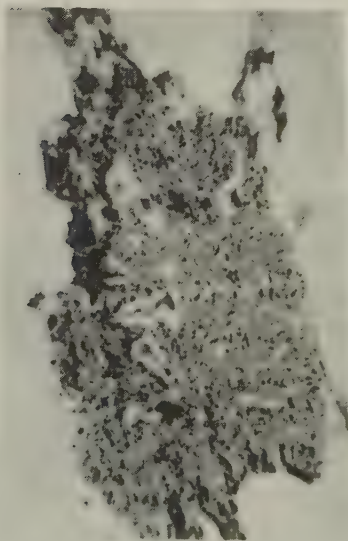
b) Insuline + oCS (5 μ g de prolactine NIH équivalent par ml)

tivité lactogène de l'oCS se manifeste chez la Lapine par la présence d'abondants produits de sécrétion dans la lumière des acini. A partir de culture d'explants de glande mammaire de Brebis, à 30 jours de gestation, l'association insuline - cortisol - prolactine - hormone somatotrope, (I.C.P.S.), ajoutée au milieu de culture pendant 10 jours, ne permet pas de développement lobuloalvéolaire. Seules quelques sécrétions sont observées dans des canaux mammaires (Fig. 101 B). En revanche, lorsqu'une incubation préalable de 48 heures en présence de l'association oestradiol 17β - progestérone (1 pour 1000) précède ce traitement (dont la durée est ramenée à 8 jours), un net développement lobuloalvéolaire est observé. Les cellules épithéliales mammaires sont bien disposées autour de la lumière. Le produit de sécrétion protéique (lactoprotéines) est abondant dans la lumière des acini (Fig. 101 B2). On peut voir aussi de gros globules gras incolores. Dans ce dernier schéma expérimental, lorsque l'oCS remplace l'association PRL - GH, des résultats identiques aux précédents sont observés, (Fig 101 B3).

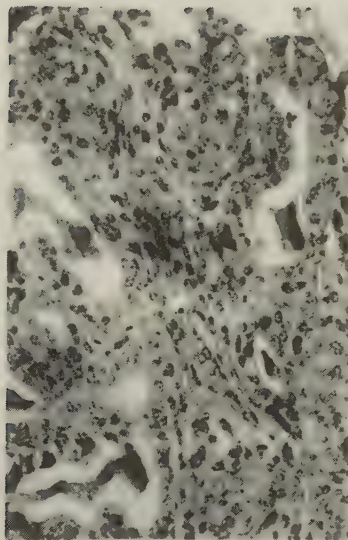
In vivo, chez la Brebis normale, l'apparition du lactose dans le tissu mammaire à partir du 95-100ème jour de gestation (DENAMUR, 1964) coïncide avec l'élévation importante du niveau sérique d'oCS (Chapitre VII) alors que le taux de la prolactine sérique est encore généralement très bas à ce stade gestatif (KANN et DENAMUR, 1974).

Chez la Brebis gestante rendue hypoprolactinémique, après traitement par la bromocryptine, la forte augmentation des ARN totaux (Fig. 95) est accompagnée par un accroissement intense du pool des nucléotides acid-solubles. L'activité enzymatique de la galactosyltransférase s'élève apparemment normalement. La capacité de synthèse de protéines spécifiques du lait par le tissu mammaire est mise en évidence à 120 jours de gestation par la synthèse in vitro de caséines α et β à des taux équivalents à ceux obtenus à partir de tissu mammaire des animaux témoins.

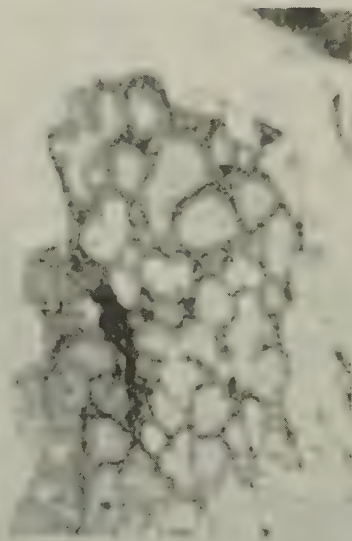
G X 80



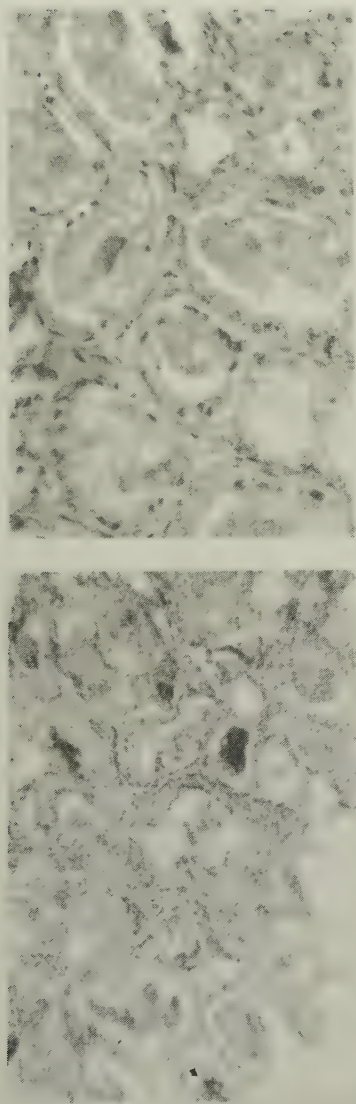
G X 200



ICPS (10j)



E_7Pg ICPS (2j) puis ICPS (8j)



E₂Pg IC-oCS (2j) puis IC-oCS (8j)

FIG.101B - CULTURE DE TISSU MAMMAIRE DE BREBIS AU 30e JOUR DE GESTATION

Coloration hématoxyline - éosine - vert lumière

I : Insuline (5 µg/ml) C : Cortisol(5µg/ml)

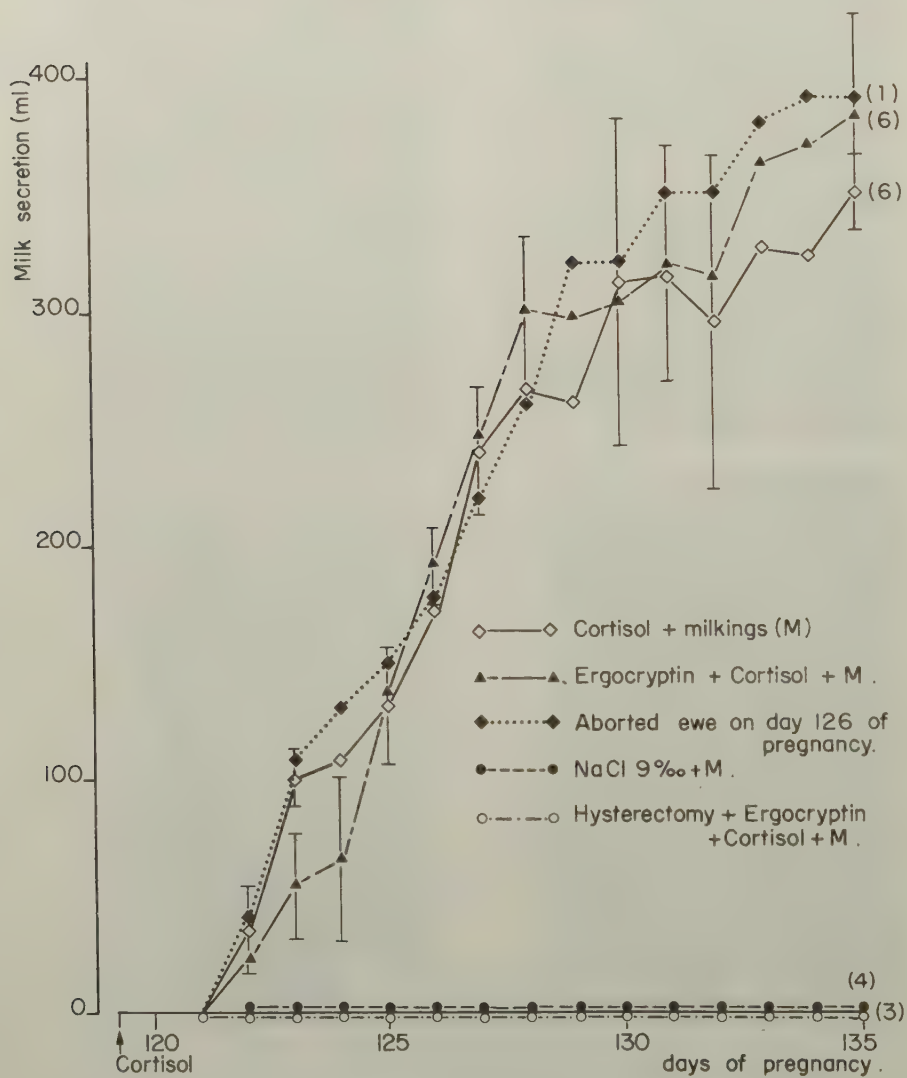
E₂ : Oestradiol 17 β (30 pg/ml) Pg : Progestérone (30 ng/ml)

P : Prolactine ovine (5 µg/ml) NIH P-S9

S : Hormone de croissance ovine (5 µg/ml) NIH GH-S10

oCS (5 µg équivalent Prolactine/ml)

Experimental induction of milk secretion during pregnancy in sheep.



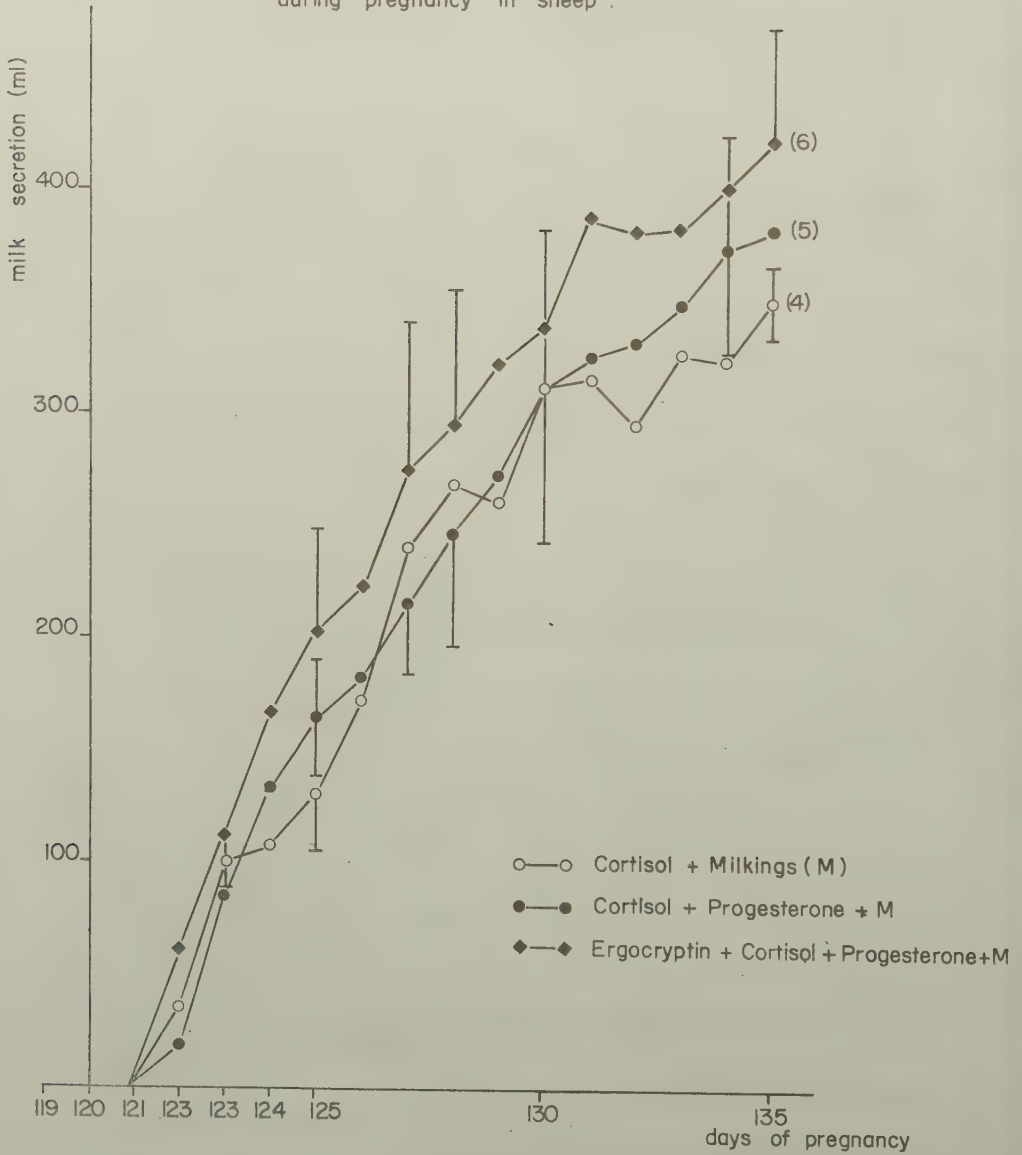
Chez l'animal à sécrétion de prolactine très inhibée (Tableau XXI, Chapitre VII), l'oCS endogène semble donc permettre une lactogénèse de gestation comparable à celle de l'animal normal.

3. oCS et capacité d'induction d'une production laitière pendant la gestation (MARTAL et DJIANE, 1977, P14x)

Lorsque l'on induit expérimentalement une sécrétion lactée par le cortisol chez des brebis gestantes, traitées par la bromocryptine, (lot I), la production laitière est équivalente à celle du lot témoin (II) dont la sécrétion de prolactine est normale (Fig. 102). Une brebis qui n'a reçu aucun traitement (lot IV) a avorté et peut servir de témoin pour apprécier une montée laiteuse normale en présence d'un développement mammaire correspondant à 120-130 jours de gestation. La Fig. 102 montre qu'il n'y a pas de différence significative entre ces animaux. Chez les animaux témoins (lot IV) qui n'ont reçu que du sérum physiologique, la production d'hormones endogènes, déclenchée par la traite, est insuffisante pour permettre la sécrétion de lait pendant la gestation. L'hormone lactogène placentaire est bien directement impliquée dans l'initiation de la lactation puisque si l'on hystérectomise au 117ème jour de gestation des brebis traitées par la bromocryptine, les injections de cortisol (lot III), commencées 48 heures après l'opération, ne permettent pas l'initiation d'une production laitière (Fig. 102). Les traces de prolactine sont donc insuffisantes pour induire une montée laiteuse normale, même en présence de cortisol lorsque l'oCS est absente (lot III).

L'hormone lactogène placentaire ovine apparaît donc capable d'induire une montée laiteuse, en présence de cortisol chez la Brebis gestante.

Experimental induction of milk secretion
during pregnancy in sheep .



L'injection de grandes quantités de progestérone (100mg/jour) en même temps que celle de cortisol à des brebis traitées par la bromocryptine (lot V) n'inhibe pas la montée laiteuse (Fig. 103).

Alors que la suppression de la progestérone (brebis avortée, Fig. 102, ou parturition normale), suffit à déclencher la montée laiteuse, la présence d'une importante concentration sérique (50mg par jour) de cortisol suffit à lever l'inhibition de la montée laiteuse pendant la gestation même en présence de grandes quantités de progestérone. Au cours de la gestation, la quantité limitante de cortisol apparaît donc empêcher l'expression de l'activité lactogène de l'OCS inhibée par la présence de fortes concentrations de progestérone.

4. Interrelations endocriniennes dans la régulation de l'expression des gènes des caséines chez la Brebis, (non publié).

L'étude des rôles respectifs de l'OCS et de la prolactine dans l'induction de l'activité sécrétoire de la cellule mammaire a été étudiée en collaboration avec Pierre GAYE, pour la quantification de l'activité messagère des ARN polysomaux des caséines.

Chez les brebis gestantes, qui ne reçoivent aucun traitement, mais qui sont hystérectomisées à 115 jours de gestation (lot I), les ARN messagers des caséines permettent une importante synthèse in vitro de caséines α et β , estimées arbitrairement à 100% (Fig. 104, Tableau XXIII). Le lot I mime une lactogénèse normale après la parturition en présence, toutefois, d'un moindre développement mammaire. Il n'y a plus d'OCS sanguine 12 heures après l'hystérectomie, ce qui est en accord avec les études de demi-vie du chapitre VII. Les taux moyens sériques d'OCS avant l'opération sont néanmoins considérables (350ng/ml environ) (lot I) (Tableau XXIII).

A cette période de gestation (115-120 jours), la prolactinémie peut déjà être élevée (KANN et DENAMUR, 1973),

TABLEAU XXIII

CONTROLE HORMONAL DE L'EXPRESSION DES GENES DES CASEINES CHEZ LA BREBIS

BREBIS GESTANTES Lot n°	Nombre de Brebis	ARN _m (cpmX10 ⁻³ ³ H-Leu/μg ARN polysomal)		oCS ng/ml		oPRL ng/ml	
		α _{s1} s ₂	β	Avant Hyst.	Après Hyst.		
1 Hystérectomisées (Hyst)	3	21,8 ±1,0	20,3 ± 0,2	360*± 140 (7)	0	339 ± 83 (12)	
2 Hyst. + F▲(0h)	3	24,7 ±6,6	21,6 ± 3,6	952 ± 441 (6)	0	87 ± 18 (16)	
3 Hyst. 1 Pg△	3	4,3 ±1,1	4,7 ± 1,4	581 ± 64 (12)	0	114 ± 44 (26)	
4 Hyst. + Ergo●	3	1,1 ±0,1	1,6 ± 0,1	372 ± 34 (8)	0	5,5 ± 1,1 (12)	
5 Hyst + Ergo● + F▲ (0h)	3	17,4 ±3,1	16,9 ± 3	650 ± 96 (36)	0	0,9 ± 0,2 (44)	
6 Hyst + Ergo● + F▲ (24h)	3	17,2 (2)	11,7 (2)	389 ± 13 (11)	0	4,5 ± 0,8 (14)	
7 Hyst + Ergo● + F▲ (72h)	3	7,8 ±0,5	6,5 ± 0,5	249 ± 50 (23)	0	4,0 ± 0,7 (37)	
8 Hyst + ergo⊙ + F▲ (5j)	3	16,7 ±2,1	14,4 ± 1,9	1133 ± 700 (8)	0	sous ergo 7±3 (24)	suppr. 2j ergo 37,7±1,9 (6)

* () Nombre d'échantillons dosés

● Bromocryptine (Ergo) injectée depuis le 70e jour de gestation

⊙ interrompue le 3e et le 4e jour après l'hystérectomie

▲ Cortisol (F) injecté pendant 5 jours à partir de 0, 24, 72h, 5j après l'opération

△ Progestérone (Pg) injectée quotidiennement à partir de la veille de l'opération.

mais la traite quotidienne, après hystérectomie, stimule beaucoup la sécrétion de prolactine ($339 \pm 83 \text{ ng/ml}$, $n=12$) (lot I) (Tableau XXIII).

L'hystérectomie totale, avec ovariectomie des animaux du lot I, supprime à la fois les sources de sécrétion placentaire et ovarienne de la progestérone et la lactogénèse est induite en présence de cortisol, de prolactine et d'hormone de croissance endogène. Ces trois hormones constituant le complexe minimum de la lactogénèse chez les ruminants (DENAMUR, 1965).

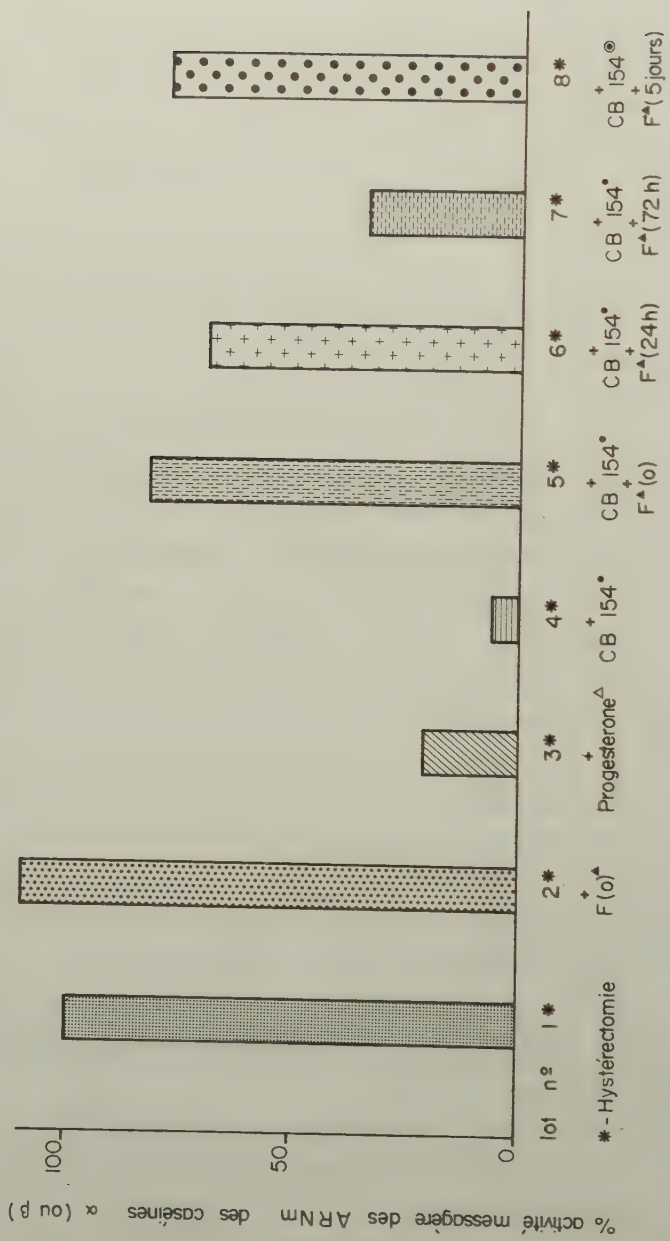
L'apport de cortisol, dès le jour de l'hystérectomie (lot II), n'entraîne pas d'augmentation significative des ARN_m des caséines α et β par rapport au lot I (Tableau XXIII, Fig. 104). Il est toutefois intéressant de noter qu'une brebis de ce lot II, portant 3 foetus, présente une quantité particulièrement élevée en ARN_m mammaires, ($33,2 \cdot 10^3 \text{ cpm } ^3\text{H-Leu}/\mu\text{g ARN polysomal}$) et une concentration également très élevée en oCS (1800 ng/ml). En revanche, sa prolactinémie est identique à celle des autres animaux ($87 \pm 8 \text{ ng/ml}$, $n = 3$). Il s'ensuit que l'oCS peut être à l'origine des taux très élevés d' ARN_m des caséines α_{S1} , α_{S2} et β observées.

Si l'on injecte de la progestérone (lot III), depuis la veille de l'hystérectomie jusqu'à l'abattage des animaux, on constate une très forte diminution de la quantité d' ARN_m des caséines ($4,5 \cdot 10^3 \text{ cpm } ^3\text{H-Leu}/\mu\text{g d'ARN polysomal}$), bien que les taux d'oCS (58 ng/ml) et de prolactine (114 ng/ml) soient considérables au début de ce traitement (Fig. 104, Tableau XXIII).

La progestérone inhibe donc environ 80% de la synthèse des ARN_m des caséines α et β .

Après hystérectomie et traitement par la bromocryptine, (lot IV), la traite ne suffit pas à induire une quantité importante d' ARN_m des caséines ($1,3 \cdot 10^3 \text{ cpm } ^3\text{H-Leu}/\mu\text{g d'ARN polysomal}$). Ceux-ci correspondent à environ 5% de ceux des brebis qui n'ont pas reçu de bromocryptine (lot I).

Contrôle endocrinien de l'expression des gènes des caséines chez la brebis



* Hystérectomie à 110-115 jours de gestation.

• Bromocryptine (CB 154) injectée depuis le 70ème jour de gestation, interrompue le 3ème et le 4ème jour après l'opération.

▲ Cortisol injecté pendant 5 jours à partir de 0,24, 72h, 5 jours après l'opération.

Δ Progestérone injectée à partir de la veille de l'opération. Abattage de tous les animaux à 120 jours de gestation.

Il s'ensuit qu'en absence d'hormone lactogène placentaire, la présence de prolactine apparaît indispensable à l'induction d'une lactogénèse.

La comparaison des lots I et IV démontre qu'en dépit de la présence des hormones endogènes (cortisol, hormone de croissance), et de la disparition de la progestérone, des traces de prolactine ($5,5 \pm 1,1 \text{ ng/ml}$) sont insuffisantes pour induire une sécrétion lactée. Une sécrétion élevée de prolactine est donc indispensable à une montée laiteuse normale. En revanche, l'injection de cortisol dès le jour de l'opération à des brebis hystérectomisées et traitées par la bromocryptine (lot V) permet la synthèse d'environ 80% d'APN_m des caséines α et β par rapport au lot témoin I. Dans ce cas (lot V), l'administration de cortisol suffit à stimuler d'environ 95% par rapport au lot IV la synthèse d'APN_m des caséines, uniquement en présence de traces de prolactine, (Fig. 104).

Lorsque le cortisol est administré 24 heures après le jour de l'hystérectomie (lot VI), la synthèse d'APN_m des caséines est nettement diminuée (70%) et 72 heures après, (lot VII) elle n'est plus que de 30% (Tableau XXIII, Fig. 104).

Ces résultats suggèrent que la lactogénèse déclenchée par le cortisol dans le lot V ne dépend pas seulement de cette hormone. Puisque seul varie le moment de l'injection dans les lots V, VI, VII, cela signifie que le cortisol n'est pas directement responsable de l'augmentation des APN_m des caséines mais qu'il présente plutôt un rôle amplificateur du signal lactogène. Ces résultats démontrent aussi que des traces de prolactine sont insuffisantes, même en présence de cortisol, pour induire une sécrétion lactée. Ils montrent également que la présence d'OCS est nécessaire au rôle amplificateur du cortisol lorsque la prolactine est réduite à l'état de traces. Puisque l'effet du cortisol se poursuit quelques jours après la disparition de l'OCS, ceci suggère que l'effet intracellulaire du complexe OCS - récepteur persiste quelques temps. Ce signal disparaissant, le

cortisol devient progressivement moins efficace. L'écart de 25% entre la synthèse des ARN_m des caséines et des lots II et V qui diffèrent seulement par l'administration de bromocryptine, suggère que la prolactine est responsable du quart environ de la synthèse des ARN_m . Il reviendrait une participation de 70 à 80% à l'oCS dans l'induction des ARN_m des caséines quand le cortisol est injecté le jour de l'hystérectomie. Ce rapport d'activités correspond grosso-modo, à celui des concentrations sériques de ces deux hormones.

Par contre, au moment de la montée laiteuse normale, après la parturition (lot I), l'induction des ARN_m des caséines résulterait essentiellement de l'effet de la prolactine, le cortisol exogène étant alors non indispensable.

L'arrêt de l'administration de bromocryptine le 3ème et le 4ème jour après l'hystérectomie (lot VIII), suffit au cortisol pour induire une quantité considérable d' ARN_m des caséines, comparable à celle du lot V (Fig. 104). Ces résultats indiquent, d'une part, qu'il suffit de la sécrétion d'une hormone lactogène pour obtenir une importantelactogénèse, et, d'autre part, que le cortisol ne suffit pas, à lui seul, à l'induction d'une lactation.

En conclusion, les fortes concentrations sériques d'oCS, précédant l'hystérectomie, suffiraient à expliquer partiellement la persistance, pendant quelques jours, du phénomène d'amplification de la synthèse d' ARN_m par le cortisol en l'absence de prolactine. Sans oCS mais en présence de prolactine, la lactogénèse est parfaitement possible. Par contre, si les niveaux sériques de prolactine sont très faibles, ils ne permettent pas au cortisol de déclencher une lactogénèse normale.

DISCUSSION

1. Croissance mammaire et oCS

L'activité mammogène de l'oCS a été mise en évidence à la fois in vitro et in vivo dans un système homologue et avec une préparation d'hormone purifiée. En culture organotypique du tissu mammaire de Brebis, l'action différenciatrice des stéroïdes ovariens doit précéder celle de l'oCS, comme dans le cas de la prolactine, (JEULIN - BAILLY et al. 1973). Les stéroïdes ovariens, seuls, ne provoquent que très peu de réponses du tissu mammaire. Une sensibilisation, pendant deux jours, des cellules épithéliales mammaires par l'association d'oestradiol 17β et de progestérone (dans un rapport de 1 à 1000) suffit au complexe oCS - hydrocortisone - insuline pour provoquer un développement lobuloalvéolaire du tissu mammaire ovin. Bien que l'insuline et le cortisol ne soient pas directement mammogènes, ces hormones sont néanmoins indispensables à l'action de l'oCS. L'action de l'insuline s'explique probablement par ses propriétés métaboliques (DENAMUR, 1969). L'action du cortisol permet sans doute d'amplifier la synthèse protéique nécessaire à l'hyperplasie cellulaire, comme nous le discuterons plus loin. En présence d'oCS, in vitro, la prolactine ne paraît pas indispensable à la mammogénèse, et réciproquement, ce qui ne signifie pas toutefois que l'action de ces deux hormones soit rigoureusement identique in vivo. En présence de prolactine, l'hormone somatotrope paraît utile pour obtenir un développement mammaire optimal in vitro (JEULIN - BAILLY et al. 1973). Il ne semble pas en être de même pour l'oCS, l'activité somatotrope de celle-ci apparaissant suffisante.

In vivo, chez la Brebis gestante rendue hypoprolactinémique après traitement par la bromocryptine, nous avons montré que la multiplication des cellules épithéliales se produit normalement. En présence d'oCS, la prolactine ne paraît donc pas indispensable à un développement normal de la glande mammaire chez la Brebis. Ces résultats sont d'autant plus importants que la mammogénèse est pratiquement terminée à la mise-bas dans cette espèce (DENAMUR, 1964). Une activité mammogène du placenta a été également suggérée par les résultats de l'hypophysectomie et de la section de tige pituitaire pratiquée chez la Brebis (DENAMUR et MARTINET, 1961) à partir du premier tiers de la gestation : en effet, un développement mammaire d'environ 40% est conservé après ces opérations. Il en est de même chez la Chèvre (BUTTLE et coll., 1979). La différence de développement de la glande mammaire entre les animaux traités par la bromocryptine et les animaux hypophysectomisés peut s'expliquer notamment par l'absence de GH et l'atrophie des surrénales chez les animaux opérés. Nous avons vu, in vitro, que la présence d'hydrocortisone était indispensable à l'action mammogène de l'oCS.

L'activité mammogène de l'oCS peut expliquer l'observation zootechnique courante que la production laitière des brebis bessonnières est d'environ 30% supérieure à celle des brebis à un seul agneau. Nous avons vu, en effet, au chapitre VII, l'étroite corrélation entre la production d'oCS et le nombre de foetus, et, ci-dessus, la forte corrélation positive entre les concentrations maternelles d'oCS et la croissance mammaire. Par ailleurs, RICORDEAU et coll. (1960), ont démontré que l'écart de production laitière entre les deux groupes d'animaux n'est pas dû à des différences dans le nombre et le rythme des stimulations mammaires.

Ces divers résultats sont en accord avec un travail récent de HAYDEN et coll. (1979 a, b) qui observent une certaine proportionnalité entre la production d'oCS, le poids frais de la glande mammaire, la production laitière et le nombre de chevreaux.

Nous avons vu que lorsque l'on considère l'ADN comme seul index de mammogénèse, la prolactine n'est pas indispensable, en présence d'oCS, au développement lobulo-alvéolaire. Mais, lorsqu'on tient également compte de l'hyperplasie cellulaire par l'estimation du poids du tissu frais, on constate que celui-ci est nettement inférieur chez les brebis hypoprolactinémiques. La présence de la prolactine hypophysaire apparaît donc néanmoins nécessaire à une bonne hydratation cellulaire, même en présence d'oCS.

Chez la Chèvre gestante traitée par la bromocryptine, le poids frais de la glande mammaire est également diminué de 50% par rapport à celui des témoins (BUTTLE et coll., 1979). Nous n'avons pas encore pu approfondir cet intéressant problème d'osmorégulation.

Rappelons toutefois que nous avons signalé au chapitre VII l'existence d'une différence d'action entre la prolactine et l'hCS, au niveau de la diffusion de l'eau à travers la membrane amniotique humaine.

Chez les Téléostéens d'eau douce, les Batraciens et les Mammifères, la prolactine provoque la rétention du sodium sanguin (NICOLL et BERN, 1972). Bien qu'il ait été très étudié chez les Poissons, (NICOLL et BERN, 1972) le rôle osmorégulateur de la prolactine est mal connu dans la physiologie de la glande mammaire. Une lactation implique pourtant le mouvement d'énormes quantités d'eau et d'électrolytes. Pour sa part, l'hCS stimulerait la sécrétion d'aldostérone, d'après MELBY et coll. (1966). On sait que cette dernière provoque notamment la rétention sodique au niveau du tubule rénal. Les surrénales des Brebis sont d'ailleurs riches en récepteurs lactogènes à l'oCS et à la prolactine (CHAN et coll., 1973 ; FRIESEN et coll., 1973 ; BOLANDER et coll., 1976 ; CHAN et coll., 1978).

L'activité mammogène de l'oCS est en accord avec les données de l'Endocrinologie comparée. En effet, des extraits placentaires stimulent la croissance mammaire chez diverses espèces, bien que la démonstration directe de l'action d'une mammotrophine chorionique purifiée n'ait pas été faite en système homologue, à notre connaissance.

Chez la Vache, la gestation (donc le placenta et la bCS), est indispensable pour obtenir une mammogénèse complète. Quels que soient les protocoles d'injections hormonales utilisés pour obtenir une lactation induite chez une génisse, les performances laitières restent inférieures à celles qui suivent une première gestation (60 à 80% de celles-ci) (TURNER et coll., 1956 ; MEITES, 1961 ; TUCKER et MEITES, 1965 ; SMITH et SCHANBACHER, 1973 ; PAAPE et coll., 1973 ; CHAKRIYARATS et coll., 1975, 1977 ; DELOUIS et coll., 1978). La prolactinémie obtenue lors de la lactation induite (DELOUIS et coll., 1978) paraît inférieure à l'activité lactogène totale sérique durant la gestation (DJIANE et coll., 1975 ; MARTAL, 1979, p25). De plus, l'activité somatotrope sérique reste très réduite au cours de ces traitements. Or la GH est la principale hormone galactopoïétique chez la Vache (HUTTON, 1957), la Chèvre (OWEN et DARROCH, 1957) et la Brebis (JORDAN et SCHAFFHAUSEN, 1954 ; DENAMUR et MARTINET, 1970). Chez les Rongeurs, l'hypophysectomie, à partir du 12ème jour de gestation, ne perturbe pas la croissance des glandes mammaires de Ratte (PENCHARZ et LONG, 1933 ; ANDERSON et TURNER, 1974) et de Souris (NEWTON, 1938). NAGASAWA et YANAI (1971) notent une bonne corrélation entre le nombre de placenta et les quantités d'ADN et d'ARN mammaires. Chez les Primates, le placenta apparaît aussi contribuer au développement de la glande mammaire. Chez la Femme normale, la croissance mammaire progresse tout au long de la grossesse (NEWTON, 1961 ; HYTTEN et LEITCH, 1963 ; REYNOLDS, 1972). L'hypophysectomie de Singe (SMITH, 1954) ou de Femme (KAPLAN, 1961) laisse subsister un développement mammaire tout au long de la gestation et même une lactation transitoire. La mCS et l'hCS (Tableau I) fournissent donc une composante mammogène importante pour le contrôle du développement mammaire (JOSIMOVITCH, 1976). Bien que leur activité n'ait été démontrée, à notre connaissance, que dans des systèmes hétérologues, l'hCS stimule, par exemple, la synthèse de l'ADN en culture d'explants mammaires de Souris (TURKINGTON et TOPPER, 1966).

2. Lactogène et oCS

L'activité lactogène de l'oCS a été étudiée au moyen de tests variés, qualificatifs et quantitatifs, à la fois in vitro et in vivo.

- In vitro, l'oCS est capable d'induire dans des explants de tissu mammaire de Lapine pseudogestante, la formation d'abondants produits de sécrétion, visibles à l'examen microscopique. En culture organotypique de tissu mammaire de Brebis, l'activité lactogène de l'oCS exige, pour se manifester, la présence de cortisol. Ces résultats miment l'action du complexe prolactine - cortisol - hormone de croissance, utilisé par JEULIN-BAILLY et coll. (1973). Comme nous l'avons constaté au cours de l'étude de l'activité mammogène de l'oCS, l'activité somatotrope de cette hormone remplace ici encore, celle de l'hormone de croissance hypophysaire. Il est important de souligner que la présence de prolactine n'est absolument pas nécessaire à l'activité lactogène de l'oCS, in vitro (MARTAL et DJIANE, 1975, P8x ; MARTAL et coll., 1975, C9x, C11). En revanche, la présence d'insuline est indispensable à la survie du tissu mammaire.

- In vivo, l'augmentation du taux sérique d'oCS (Chapitre VII) coïncide avec l'apparition du lactose dans la glande mammaire à 95-100 jours de gestation (DENAMUR, 1965). L'injection de cortisol à partir du 100ème et surtout du 120ème jour de gestation, induit expérimentalement, chez la Brebis, une sécrétion lactée (DELOUIS et DENAMUR, 1967). Nous avons vu qu'en ajoutant aux injections de cortisol un puissant inhibiteur de la sécrétion hypophysaire de prolactine, la bromocryptine, nous obtenons des résultats identiques, ce qui indique clairement qu'in vivo, comme in vitro, la présence de la prolactine n'est pas indispensable et ce qui suggère que l'oCS, dont les taux sanguins sont nettement plus élevés que ceux de la prolactine à 100 jours de gestation, puisse être responsable de la lactogénèse de gestation. De plus, chez la Brebis gestante hypoprolactinémique, on observe

à partir du dernier tiers de la gestation, une augmentation normale du contenu mammaire en ARN totaux et en nucléotides acido-solubles, de l'activité lactosynthétase et de la synthèse des lactoprotéines. Ces résultats sont donc en parfait accord avec l'interprétation précédente. Nos résultats sont également en accord avec la notion du complexe lactogène minimum chez les Ruminants, énoncée par R. DENAMUR, (1971) : 3 hormones in vivo (PRL - GH - cortisol) et 4 in vitro sont nécessaires pour obtenir une lactogénèse. Cette notion de triple "verrou"* in vivo est intéressante à souligner et suggère 3 niveaux de dérégulation hormonodépendants lors de la transcription des ARN messagers des protéines spécifiques du lait. Cette exigence supplémentaire par rapport aux autres espèces (DENAMUR, 1971) rencontrée chez les Ruminants, dans le contrôle de leur mammogénèse et de leur lactogénèse est peut-être à rapprocher de l'observation clinique classique que les Ruminants ne sont pas sujets aux tumeurs mammaires. Il est intéressant de se demander comment est contrôlée la lactogénèse de gestation dans les diverses espèces. Nous avons vu que l'augmentation du taux sanguin d'OCS peut, à elle seule, expliquer cette lactogénèse chez la Brebis. Soulignons notamment que, dans cette espèce, les taux sériques de progestérone, hormone réputée inhibitrice de la lactogénèse (HARTMANN et coll., 1973) n'ont pas tendance à diminuer lors de l'apparition du lactose (BASSETT et coll., 1969 ; LEMON et THIMONIER, 1973) et la cortisolémie maternelle ne semble pas particulièrement augmentée au cours de la gestation (FEVRE, 1974). Chez la Ratte, l'action lactogène de la mammothrophine chorionique (rCM) paraît être fortement inhibée par l'action de la progestérone. L'apparition tardive du lactose mammaire (20ème jour de gestation, DENAMUR, 1965) peut s'expliquer par les faibles taux d' α lactalbumine, protéine régulatrice de l'activité lactosynthétase (BREW et coll., 1968 ; MURPHY et coll., 1973). Ce n'est que près de la parturition que la progestérone est dégradée en un composé inactif sur l'inhibition de la lactogénèse, la 20α - OH - progestérone (KUHN, 1969). Chez la Lapine, qui ne possède pas d'hormone lactogène placentaire (Introduction

* En fait, il est très difficile à l'heure actuelle de dire si l'GH et le cortisol participent réellement au contrôle (verrou biologique) de la fonction physiologique chez les Ruminants ou si elles présentent une action synergique (comme le cortisol chez la Lapine) ou permissive (comme l'insuline).

Générale), l'activité lactogène sérique de la prolactine paraît constante tout au long de la gestation (DURAND et DJIANE, 1977), alors que le lactose apparaît durant le début du dernier tiers de la gestation (DENAMUR, 1965). C'est probablement la baisse précoce de la progestérone (CHALLIS et coll., 1973) qui serait responsable du déclenchement de la lactogénèse de gestation. Chez les autres espèces, ce phénomène correspond, sans doute, à l'un des modèles étudiés ci-dessus mais aucune étude systématique n'a été effectuée, à notre connaissance. On sait que le message hormonal est transmis au génôme par l'intermédiaire de récepteurs cellulaires. Chez la Brebis, BORJESSON et NIALL (1979), émettent l'hypothèse qu'il existe deux espèces de récepteurs lactogènes : le récepteur prolactinique et le récepteur à hormone lactogène placentaire. Ces auteurs montrent, en effet, que l'hCS se lie aux membranes de tissu mammaire de Brebis gestantes, mais très peu aux membranes de tissu mammaire de lactation. En revanche, l'hGH se lie aux deux types de membranes et est déplacée par l'hCS sur les membranes de Brebis gestante. En raison de la très faible activité somatotrope de l'hCS et de la forte activité lactogène de l'hGH, cette dernière hormone semble être capable de se lier à deux types de récepteurs lactogènes. En réalité, ces résultats ne sont toutefois pas rigoureusement clairs car l'oPRL n'entre que très peu en compétition avec l'hGH. Bien que l'oGH soit importante dans la physiologie de la lactation des Ruminants, celle-ci ne se fixe à aucun type de membranes utilisées.

En définitive, il est possible qu'une population de récepteurs lactogènes à oCS puisse être induite au cours de la gestation chez la Brebis. Ce travail mérite de plus amples développements. L'existence de plusieurs classes de différents récepteurs lactogènes pendant et après la gestation, serait de première importance dans la compréhension de la physiologie de la lactation des Ruminants domestiques. Chez la Lapine, le récepteur prolactinique du tissu mammaire a été déjà très étudié. Il a été partiellement purifié et caractérisé (SHIU et FRIESEN, 1974 a, b ; GUTGEN et coll.,

Sa présence est absolument nécessaire, pour que la cellule puisse capter le message hormonal puisque des anticorps anti-récepteur prolactinique bloquent l'action de la prolactine (SHIU et FRIESEN, 1976). On sait aussi que la prolactine est capable d'induire ses propres récepteurs chez la Lapine, (DJIANE et DURAND, 1977), comme chez la Ratte (POSNER et coll., 1975 ; COSTLOW et coll., 1975 ; MANNI et coll., 1978). Aussi, ne serait-il pas déraisonnable de penser qu'il en est de même chez la Brebis : on ne sait pas encore si l'oCS peut induire également ses propres récepteurs. Les concentrations plasmatiques élevées de cette hormone pourraient favoriser cette induction. Il est encore intéressant de souligner que chez la Lapine, l'induction de récepteurs prolactiniques par la prolactine est inhibée par la progestérone (DJIANE et DURAND, 1977). D'ailleurs, la quantité de récepteurs à la prolactine par cellule (ou par glande mammaire), est particulièrement basse et augmente près de 10 fois, à la parturition (DJIANE et coll., 1977). La croissance de la glande mammaire de la Lapine se poursuit apparemment sans interruption ni atténuation jusqu'au 5ème jour de la lactation (DENAMUR, 1963). L'apparition des phénomènes sécrétoires (22-23 jours) se situe au cours d'une phase mitotique très active qui débute entre le 20ème et le 21ème jour de la gestation (DENAMUR, 1963). D'après l'évolution des récepteurs lactogènes et des taux sériques de prolactine, il n'est pas possible de distinguer la mammogénèse du début de la lactogénèse. Seule la progestéronémie semble diminuer. L'analogie des complexes hormonaux de mammogénèse et de lactogénèse pose le problème de la distinction fondamentale de ces deux fonctions. Il semble que l'absence de lactogénèse puisse être imputée à deux causes, soit l'insuffisance d'hormone lactogène, soit l'effet inhibiteur de la progestérone.

- En effet, chez la Lapine vierge, SHUSTER et coll. (1976), notent la présence d'ARN messagers spécifiques des caséines à un stade où les acini mammaires ne sont pas encore différenciés, le tissu mammaire étant réduit à ses canaux. La prolactine est d'ailleurs capable de stimuler l'activité sécré-

toire mesurée par la synthèse d'ARN_m des caséines chez l'animal vierge (HOUDEBINE, 1973).

- D'autre part, DENAMUR et DELOUIS, (1972) montrent chez la Lapine pseudogestante que la progestérone n'affecte pas le nombre de cellules épithéliales mammaires induit par la prolactine mais réduit seulement la quantité d'ARN totaux. ASSAIRI et coll. (1974), montrent que la progestérone diminue le contenu mammaire en ARN polysomal et HOUDEBINE et GAYE (1975) précisent que de grandes quantités d'ARN_m des caséines ne sont détectables chez la Lapine qu'en présence de prolactine et qu'en absence de progestérone. Chez la Lapine pseudogestante, qui possède donc un certain taux de progestérone, une administration de prolactine peut accroître considérablement la concentration d'ARN_m des caséines. Chez la Brebis hystérectomisée à 115 jours de gestation, nous avons vu, avec P. GAYE, que l'activité messagère des ARN_m des caséines α et β était considérablement réduite après injection quotidienne de progestérone à partir de la veille de l'opération. En conséquence, si la présence d'ARN_m des caséines peut être observée très précocément dans le tissu mammaire, la progestérone paraît en réduire nettement la quantité. Chez la Brebis hystérectomisée et traitée par la bromocryptine, la synthèse d'ARN_m des caséines est presque complètement inhibée mais il suffit d'interrompre deux jours le traitement, pour autoriser une très abondante synthèse d'ARN_m. En revanche, après le deuxième tiers de la gestation, donc en présence de grandes quantités d'OCS et de progestérone ovarienne et placentaire, il suffit d'injecter du cortisol pour induire une importante lactation (DELOUIS et DENAMUR, 1967). Dans ces conditions expérimentales, l'administration de bromocryptine permet encore cette montée laiteuse (MARTAL et DJIANE, 1977, P14 x), et la forte quantité de progestérone endogène ne suffit cependant plus alors à inhiber la sécrétion lactée induite. En culture d'explants mammaires de Brebis, à 30 jours de gestation, lors de l'absence de séquence oestrogène-progestérone (1/1000), le

tissu mammaire ne se développe pas, mais, on peut obtenir une certaine activité sécrétoire dans les canaux mammaires, avec le mélange ICSP (Insuline - Cortisol - hormone somatotrope - prolactine) ou IC-oCS (Insuline - Cortisol - oCS) pendant 10 jours. Durant la mammogénèse, il semble que tout l'équipement biochimique cellulaire nécessaire à la lactogénèse existe, mais que celle-ci soit fortement inhibée par la progestérone. En revanche, le cortisol est capable de lever cette inhibition. Lors de la montée laiteuse normale de la gestation, la simple disparition de la progestérone (HARTMANN et coll., 1973) et la forte sécrétion de prolactine (KARG et coll., 1972; KANN et coll., 1978), permettent d'initier une forte production laitière.

En conclusion, nous avons analysé dans ce chapitre, l'activité lactogène de l'oCS par comparaison avec celle de la prolactine, l'activité amplificatrice et permissive des glucocorticoïdes chez les Ruminants, et l'activité inhibitrice de la progestérone sur la lactogénèse, mais non sur la mammogénèse. Nous avons retrouvé, lors de la croissance mammaire, l'importance d'une séquence oestroprogestéronique pour sensibiliser la cellule épithéliale mammaire à l'action des hormones lactogènes. Bien que nous nous soyons particulièrement intéressés à la Brebis qui correspond à l'un des modèles de physiologie de la lactation particulièrement complexe, nous avons souvent fait appel aux travaux réalisés chez la Lapine dont les composantes endocrinologiques sont beaucoup moins sophistiquées. Bien que les équilibres hormonaux apparaissent très différents d'une espèce à l'autre, du point de vue biochimique, les différences semblent essentiellement provenir de leur capacité relative de dérégulation au niveau de la duplication de l'ADN lors de la division cellulaire et au niveau de la transcription, principalement lors de la lactogénèse.

La différence fondamentale entre mammogénèse, lactogénèse de gestation et montée laiteuse apparaît plutôt de nature quantitative que qualitative, la synthèse protéique étant plus ou moins débloquée au niveau du génôme et les ARN_m des lactoprotéines plus ou moins abondants. Néanmoins, la Brebis montre la complexité des "verrouillages" biologiques

depuis la première séquence oestroprogestéronique jusqu'à la levée de l'inhibition progestéronique de la lactogénèse, en passant par l'action stimulatrice des hormones lactogènes, des glucocorticoïdes et de la STH. Un certain nombre de mécanismes d'action restent imprécis mais nous avons vu que la prolactine (et peut-être l'OCS), stimule les récepteurs lactogènes ainsi que les ARN_m des lactoprotéines et que la progestérone a un effet inverse. Le cortisol peut entrer en compétition avec la progestérone au niveau du transporteur plasmatique de la transcortine (CHAN et SLAUNWHITE, 1977). Il semble agir surtout au niveau du récepteur progestéronique en favorisant la dérégulation des gènes des lactoprotéines, (DEVINOY et coll., 1979).

Seule, la compréhension intime des mécanismes cellulaires permettra de répondre aux nombreuses interrogations encore posées par la régulation endocrinienne de la cellule épithéliale mammaire et par son dérèglement pathologique.

CHAPITRE XI

oCS et maintien

du corps jaune gestatif

Chez tous les Mammifères placentaires, la progestérone paraît nécessaire à l'établissement et au maintien de la gestation. Selon les espèces, les ovaires sont indispensables pendant une période plus ou moins longue. Chez la Brebis (DENAMUR et MARTINET, 1955), comme chez la Femme, (TULSKY et KOFF, 1957), l'ovariectomie, pratiquée avant le 50ème jour de gestation, provoque l'avortement. En revanche, l'injection quotidienne de progestérone à des brebis ovariectomisées, quelques jours après leur accouplement, permet l'implantation de l'oeuf (FOOTE et coll., 1957 ; MOORE et ROWSON, 1959 ; BINDON, 1973) et le maintien de la nidation. La transformation du corps jaune cyclique en corps jaune gestatif n'entraîne pas de modifications apparentes des structures lutéales et de la sécrétion de la progestérone, (EDGAR et RONALDSON, 1958 ; SHORT et MOORE, 1959 ; BASSETT et coll., 1959 ; FYLLING, 1970). Les conditions hormonales nécessaires au maintien du corps jaune sont encore incomplètement connues. Un ensemble de facteurs d'origine hypophysaire et trophoblastique, permettrait, chez la Brebis, d'inhiber l'involution cyclique du corps jaune induite par la prostaglandine F2 α (DENAMUR, 1973). JOSIMOVITCH et coll., (1963), ont montré que l'hormone lactogène placentaire humaine est lutéotrophique chez la Ratte. L'action de l'hCS peut même être synergique de celle de la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) chez la Ratte pseudogestante et hypophysectomisée (JOSIMOVITCH, 1968).

Chez la Brebis, le corps jaune gestatif restant normalement fonctionnel, quoique non indispensable, jusqu'au 140ème jour (MOOR et ROWSON, 1969 ; MARTAL et DJIANE, 1977, P15x), le maintien de son activité tout au long de la gestation mérite d'être expliqué. Un rôle lutéotrophique de l'OCS

peut donc être envisagé. Il est également important, pour apprécier correctement les équilibres endocriniens, de savoir s'il existe une gonadotrophine chorionique chez la Brebis. Nous nous sommes demandé si l'oCS qui est sécrétée très précocément au cours de la gestation (Chapitre VIII), n'est pas le signal embryonnaire qui prévient l'organisme maternel de son état de gravidité. Enfin, ces dernières études sur le rôle du conceptus nous ont permis de mettre en évidence une protéine antilutéolytique que nous avons appelé trophoblastine.

MATERIELS ET METHODES

1. Animaux

- Un groupe de 40 brebis gestantes de race Préalpes du Sud déjà utilisé pour les études de croissance foetale (Chapitre VIII) et de mammogénèse (Chapitre X) reçoit deux fois par jour (2 x 1mg) de la bromocryptine, à partir du 70ème jour de gestation jusqu'à l'abattage, celui-ci étant pratiqué à des stades variés.
- Un second groupe (de 52 brebis) sert de témoin. Les corps jaunes de ces deux groupes sont soigneusement énucléés et pesés lors de l'abattage des animaux.
- Un troisième groupe de brebis donneuses d'embryons est divisé en lots de 15 animaux dont le cycle oestral est synchronisé au moyen d'éponges vaginales imprégnées de progestagène (30mg de 17α -acetoxy- 9α - 11β -hydroxyprogesterone : SEARLE) (ROBINSON, 1965 ; SHELTON, 1965 ; ROBERTS, 1966 ; THIMONIER et COGNIE, 1977). Ces éponges sont enlevées après 14 jours, et les brebis reçoivent alors 300 UI de PMSG,

(Pregnant Mare Serum Gonadotropin) SEARLE. Les femelles sont saillies deux fois le jour de l'oestrus (J_0). Aux 14ème, 15ème et 16ème jours de gestation, les embryons sont prélevés chirurgicalement après clampage du col utérin et lavage de l'utérus par une solution stérile de sérum physiologique (NaCl 9 ‰), celle-ci est injectée à partir de l'extrémité de la corne utérine adjacente au corps jaune. Les embryons sont récupérés à travers un cathéter en silastic, fixé à l'extrémité de l'autre corne utérine, puis congelés et conservés à -15°C , jusqu'au moment de l'emploi.

- Un quatrième groupe constitué de brebis "receveuses" est divisé en deux lots dont l'un est opéré durant la période sexuelle naturelle des animaux (de juillet à février), et l'autre pendant l'oestrus saisonnier. Les cycles oestriens sont alors induits chez les brebis en anoestrus au moyen de rythmes lumineux artificiels (ORTAVANT, 1977). Après plusieurs cycles normaux, les brebis receveuses sont anesthésiées avec de l'halothane (Fluothane : ICI), une laparotomie est pratiquée le long de la ligne blanche et les corps jaunes sont marqués à l'encre de Chine. Un cathéter stérile en silastic (polydiméthylsiloxane, DOW CORNING, de 1,7mm de diamètre externe, 0,8mm de diamètre interne, et de 80cm de longueur) est fixé à la corne utérine adjacente au corps jaune. Ce tube présente deux arrêts en positions médiane et terminale. L'arrêt terminal est introduit et fixé avec un catgut à l'intérieur de l'extrémité de la corne utérine, puis l'étanchéité du système est testée. L'autre extrémité du cathéter est fermée avec du fil de lin et retirée de la cavité abdominale au moyen d'une aiguille Reverdin, puis fixée à la laine. Après abattage des brebis receveuses, à des stades variés, l'étanchéité de la partie du cathéter située à l'intérieur de la corne utérine est contrôlée de nouveau. Les corps jaunes marqués à l'encre

de Chine sont énucléés et pesés. L'absence de toute infection bactérienne est également testée (en collaboration avec R. DUCLUZEAU).

- Des Rattes immatures (de race WISTAR, IFFA), âgées de 27 jours sont traitées par une injection de 50 UI de PMSG (1860 UI/mg) puis reçoivent trois jours plus tard 50 UI d'hCG (human Chorionic Gonadotropin) (2660 UI/mg ORGANON). Les animaux sont sacrifiés 28 jours après ce dernier traitement, les ovaires sont alors prélevés, entaillés et maintenus en survie environ 3 heures par incubation ou périfusion.

2. Matériels injectés par voie intrautérine aux Brebis receveuses.

Puisque le disque embryonnaire de Brebis est particulièrement petit aux 14-16èmes jours de gestation (Fig. 67), par comparaison au trophoblaste, nous préférons au terme d'embryon celui de trophoblaste, au sens large. En revanche, à 21-23 jours (Fig. 67), le terme d'embryon désigne à la fois l'embryon et le trophoblaste, car l'embryon est nettement visible, à l'oeil nu, à ce stade de développement. Tous les matériaux sont injectés par voie intrautérine en présence de 20000 UI de pénicilline G par ml. Le comportement sexuel des brebis receveuses est contrôlé le matin et le soir en présence d'un bélier vasectomisé.

Traitement 0 : les brebis reçoivent une injection de 2ml de sérum physiologique stérile (NaCl : 9 ‰) pendant 11 jours.

Traitements 1 et 2 : des homogénats de trophoblaste âgés de 14-16 jours (Traitement 1) et d'embryons de 21-23 jours, (Traitement 2), sont préparés dans du NaCl (9 ‰) au moyen de seringues stériles de polypropylène et sont injectés à raison de deux embryons par jour et par brebis.

Traitements 3 et 4 : des homogénats de trophoblastes 14-16 jours (2ml) sont chauffés à 80°C pendant 30mn, (Traitement 3) ou incubés à 37°C pendant 2 h avec de la pronase (1mg/ml, pronase SIGMA, protéase non spécifique extraite de Streptomyces griseus, 3-4 unités/mg, stérilisée sur filtre Millipore) (Traitement 4).

Traitements 5,6,7 : des homogénats de trophoblastes âgés de 14-16 jours sont extraits à 4°C pendant 4 h à pH 7, (sérum physiologique) (Traitement 5), à pH 8 (Traitement 6) ou à pH 9,6 (Traitement 7) dans un tampon bicarbonate d'ammonium (0,05M, KCl 0,1M) puis centrifugés à 3000g pendant 30mn.

Traitement 8 : des homogénats de trophoblastes âgés de 14-16 jours sont extraits en présence de tampon bicarbonate d'ammonium (0,05M) et de KCl (0,1M) à pH 9,6, et centrifugés à 105000g. Le surnageant est déposé sur une colonne (4,5 x 140cm) d'Ultrogel AcA54 (LKB) équilibrée dans le même tampon à pH 9,6. L'effluent est dialysé, lyophilisé, puis injecté pendant 10 jours (équivalent de 3 trophoblastes/jour/animal).

Traitement 9 : une dose quotidienne de 15 ou 1500 UI d'hCG est injectée du 12ème au 17ème jour du cycle.

Traitement 10 : une dose de 50 µg d'oCS (20 UI/mg) d'équivalent prolactine ovine NIH-P-S7 24 UI/mg et 0,8 UI/mg d'oGH NIH 1 UI/mg) dissoute dans du sérum physiologique, est injectée du 12ème jour jusqu'au retour des chaleurs.

Traitement 11 : des cotylédons placentaires (maternels et foetaux) de brebis au 120ème jour de gestation, sont extraits dans 5 volumes de tampon bicarbonate d'ammonium

(0,05M), pH 9,6 contenant du KCl (0,3M) pendant 4 h à 4°C puis centrifugés à 15000g pendant 30mn. Deux ml d'extraits placentaires sont administrés quotidiennement par voie utérine, du 12ème jour du cycle jusqu'au retour des chaleurs.

3. Dosage radioimmunologique de la progestérone

Pour identifier d'éventuelles "chaleurs silencieuses" et déterminer l'activité fonctionnelle des corps jaunes, des échantillons sanguins sont prélevés quotidiennement à la veine jugulaire dans des tubes à vide sans anticoagulants, (BECTON-DICKINSON). Les concentrations sériques de progestérone sont déterminées par un dosage radioimmunologique à double anticorps. L'immunsérum anti-progestérone a été aimablement fourni par J.FEVRE et P. ROMBAUTS. Il a été obtenu par immunisation de lapins avec du 11α -hémisuccinate de progestérone couplée à la sérum-albumine bovine avec de la carbodiimide. L'antisérum présente une réaction immunologique croisée de 7,5 % avec la 5α pregnane-3,20 dione et la désoxycorticostérone. Les activités croisées des autres stéroïdes sont inférieures à 2 %. Les échantillons de sérum sont extraits avec de l'hexane et l'immunsérum de Lapin anti-progestérone est précipité avec un sérum de mouton anti γ -globuline de Lapin. Du sérum témoin provenant de brebis gestantes ovariectomisées est régulièrement introduit dans chaque courbe standard. La limite de sensibilité du test est d'environ 0,2ng/ml et les coefficients de variations intra et inter-test sont respectivement d'environ 10 et 15 %.

4. Dosage radioimmunologique de la 20α - OH - Progestérone (ou 20α -dihydroprogestérone, 20α OH - Pg ou 20α DH Pg)

Ce métabolite de la progestérone est dosé après extraction à l'éther (80 % environ de récupération, évaporation à 40°C et dissolution dans un tampon phosphate (0,1 M).

pH 7,4 contenant 1 % de gélatine (PPOLABO). Cette solution (0,1ml) (ou la solution standard de 20α - OH - Pg) est ajoutée à la ^3H - 20α - OH - Pg (0,1ml, INSTITUT PASTEUR) dans des tubes de polypropylène. La constante d'association moyenne de l'anticœur anti - 20α - OH - Pg est de $1,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Le seul stéroïde montrant une réaction croisée significative est la 20α - OH - Progestérone (6 %). Les tubes sont agités au Vortex et maintenus équilibrés pendant 30 mn à la température de la pièce puis la réaction est arrêtée en laissant les tubes au moins 15 mn à 0°C. Une solution de Charbon-Dextrane (1ml, à la concentration 2,5 % de charbon et 0,25 % de dextrane dans du tampon d'incubation), est ajoutée rapidement à chaque tube. Après 10 mn de contact, les tubes sont centrifugés à 2000 g pendant 5 mn. La radioactivité est mesurée sur un aliquote du surnageant. Les liaisons non spécifiques sont inférieures à 4 %. Les caractéristiques du dosage sont équivalentes aux précédentes.

5. Périfusion

Cette technique est réalisée en collaboration avec Mme P. HERMIER, selon la méthode de HASHIMOTO et coll., (1975). Les corps jaunes de plusieurs rattes sont incisés et groupés avant leur répartition dans des fioles d'incubation. Le milieu d'incubation comprend du tampon Krebs-Ringer, pH 7,4, contenant du glucose (2 %) et de la sérualbumine bovine (5 %). Le tissu ovarien est exposé à un flux continu de milieu d'incubation à 37°C, sous agitation et oxygéné par un mélange O_2 - CO_2 (95-5 %). Un débit constant du milieu d'incubation (4ml/h) est assuré par une pompe péristaltique multicanaux (GILSON). Le milieu effluent est collecté par fractions de 4ml pendant 5 h. A la suite de ce traitement, le tissu est homogénéisé dans le même tampon, centrifugé à 105000g et le surnageant est congelé pour la détermination des concentrations en 20α - OH - progestérone.

6. Incubation

Cette technique a été également réalisée en collaboration avec Mme P. HERMIER (CNRS, Gif-sur-Yvette) (De La Llosa-Hermier et coll., 1979). Dans ces expériences, les fragments de corps jaunes sont également groupés dans des fioles d'incubation. Après 30 mn de préincubation, le milieu est renouvelé et l'incubation est réalisée pendant 3 h dans un Bain-Marie à 37°C sous agitation constante. Les milieux d'incubation sont saturés par le mélange O_2 - CO_2 (95-5 %/oo), et changés toutes les 30 mn. Le même tampon que celui de la périfusion est utilisé. A la fin de l'incubation, le tissu est homogénéisé, centrifugé et conservé, ainsi que les milieux d'incubation à -15°C jusqu'au moment des dosages. Ces expériences de périfusion et d'incubation sont réalisées au moins trois fois pour chaque hormone à partir de lots de 6 à 8 ovaires par flacon.

7. Détermination de l'activité 20 α -OH-stéroïde déshydrogénase

L'activité de la 20 α -OH-stéroïde déshydrogénase, (20 α -OH-SDH) est déterminée selon la méthode de WIEST (1959). Après homogénéisation du tissu ovarien dans du tampon Tris-HCl (0,1M), pH 7,4, contenant 0,1M de sucrose, l'homogénat (1g de tissu frais/3ml de tampon) est filtré à travers de la laine de verre, centrifugé pendant 1 h à 105000g puis le culot est éliminé. Un aliquot du surnageant (1,5ml) est préincubé pendant 30 mn à 37°C en présence de NADPH (0,45 μ mole/0,5ml de tampon). La réaction est initiée par l'addition de progestérone (8.10^{-6} M) et arrêtée par congélation. La 20 α -OH-Pg formée est déterminée par dosage radioimmunologique.

8. Dosage radiorécepteur de l'activité LH-hCG sur membranes de corps jaunes de Ruminants (LACROIX et MARTAL, 1979, P27)

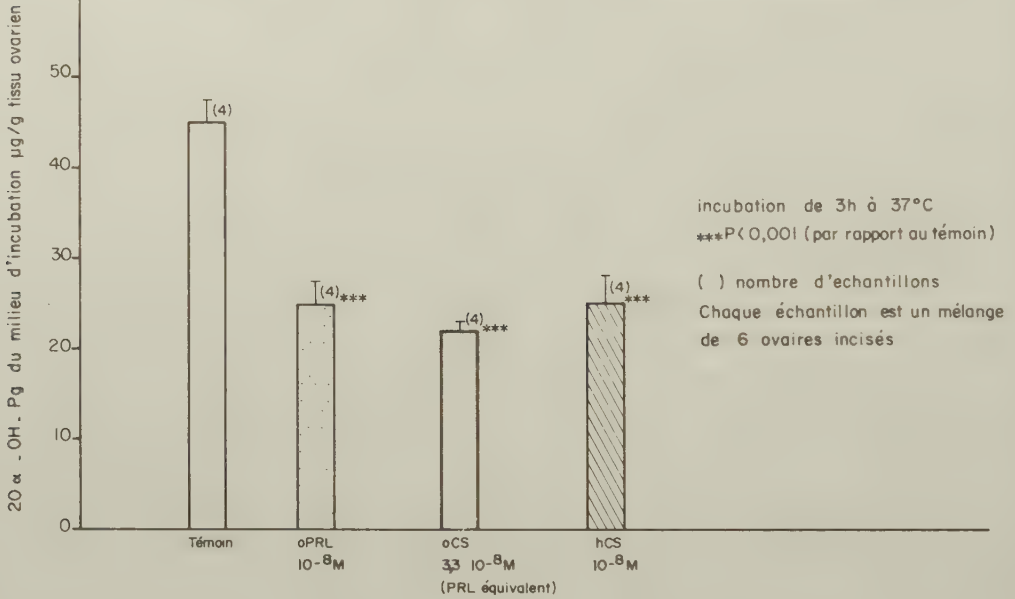
En collaboration avec M.C. LACROIX, les corps jaunes sont prélevés sur des ovaires de Brebis en cycle ou en gestation et conservés congelés à -15°C jusqu'à leur utilisation. Les membranes sont préparées selon le protocole décrit au Chapitre I, Fig. 10. La LH ovine M_3 ($1,6 \times \text{NIH-LH5}_1$) fournie aimablement par M. JUTISZ, est radioiodée par G. KANN, selon la méthode décrite au Chapitre I, pour diverses hormones. Une quantité de $600 \mu\text{g}$ de membranes est incubée pendant 3 h à la température de la pièce, en présence de LH ovine radioiodée (10^5cpm) et d'hormone non radioactive provenant des échantillons à doser ou des hormones standard (LHM_3 ou hCG 1500UI ORGANON/mg). Les coefficients de variation intra et inter-test sont respectivement d'environ 7 et 15 %. La sensibilité du dosage est d'environ 20ng/ml . Les extraits placentaires sont préparés selon la technique décrite au Chapitre VII.

9. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide

L'électrophorèse du liquide utérin des brebis receveuses et de divers extraits de trophoblastes âgés de 14 et de 23 jours sont réalisés par la méthode d'ORNSTEIN (1964) et DAVIS (1964), à pH 9,6, sur gels de polyacrylamide à 7,5 %, selon la technique décrite précédemment (Chapitre III). De même, des trophoblastes de 14 jours sont extraits à pH 9,6, centrifugés à $105000g$ et fractionnés sur une colonne d'Ultrogel AcA 4-4 ($1,5 \times 100 \text{cm}$, tampon bicarbonate d'ammonium $0,05 \text{M}$ pH 9,6). Après lyophilisation, les effluents sont analysés par électrophorèse.

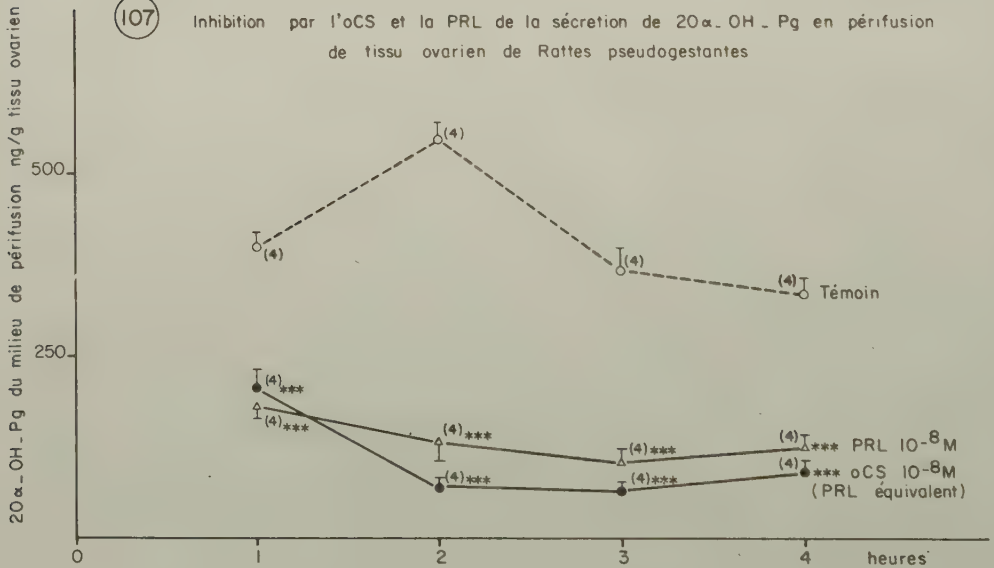
106

Inhibition par l'oCS, l'hCS et la PRL de la sécrétion de 20α -OH-Progestérone (20α -OH-Pg) en incubation de tissu ovarien de Rattes pseudogestantes



107

Inhibition par l'oCS et la PRL de la sécrétion de 20α -OH-Pg en périfusion de tissu ovarien de Rattes pseudogestantes



10. Examens bactériologiques

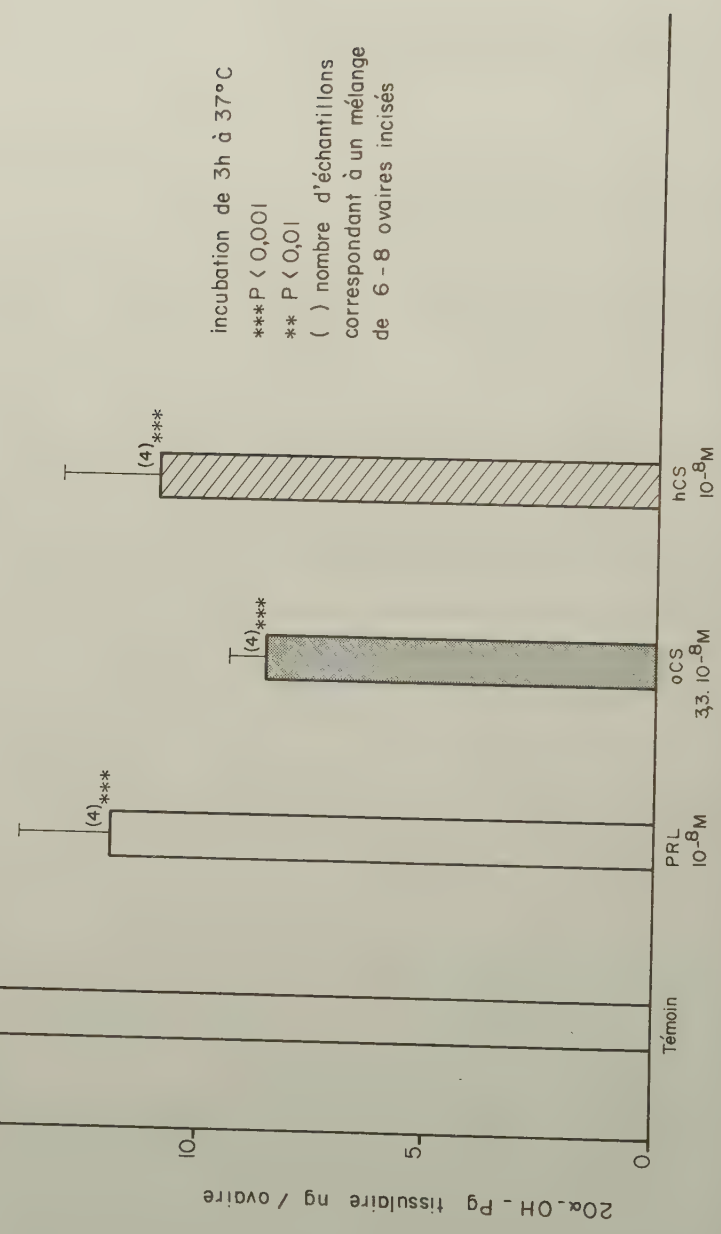
Ils sont réalisés au laboratoire de microbiologie de JOUY par R. DUCLUZEAU. Une recherche systématique de germe aérobie ou anaérobie est effectuée sur les liquides utérins des brebis "pseudogestantes".

RESULTATS

1. Activité lutéotrophique de l'oCS in vitro (non publié).

En incubation et en périfusion de fragments d'ovaires de Rattes pseudogestantes, la prolactine, l'oCS et l'hCS (à la concentration de 10^{-8} M) inhibent d'environ 50 % l'excrétion tissulaire de la 20α -OH-progestérone (Fig. 106 et 107). La concentration tissulaire de 20α -OH-Pg est également diminuée en présence de ces hormones (Fig. 108). Cependant, les quantités de progestérone dégradée sont 100 fois moins élevées dans la technique de périfusion que dans celle d'incubation. Les hormones lactogènes placentaires (oCS et hCS) sont donc capables d'inhiber le catabolisme de la progestérone en son principal métabolite, la 20α -OH-progestérone, comme cela a déjà été observé pour la prolactine (DE LA LLOSA-HERMIER et coll., 1979). Le dosage de l'activité 20α -OH-stéroïde déshydrogénase dans les homogénats de tissu ovarien, incubés ou en périfusion, confirme les résultats précédents : les hormones lactogènes étudiées inhibent l'activité de cet enzyme (Fig. 109). Il est intéressant de remarquer que des quantités identiques de prolactine et d'oCS qui ont des activités lactogènes analogues provoquent des inhibitions comparables de l'activité 20α -stéroïde déshydrogénase.

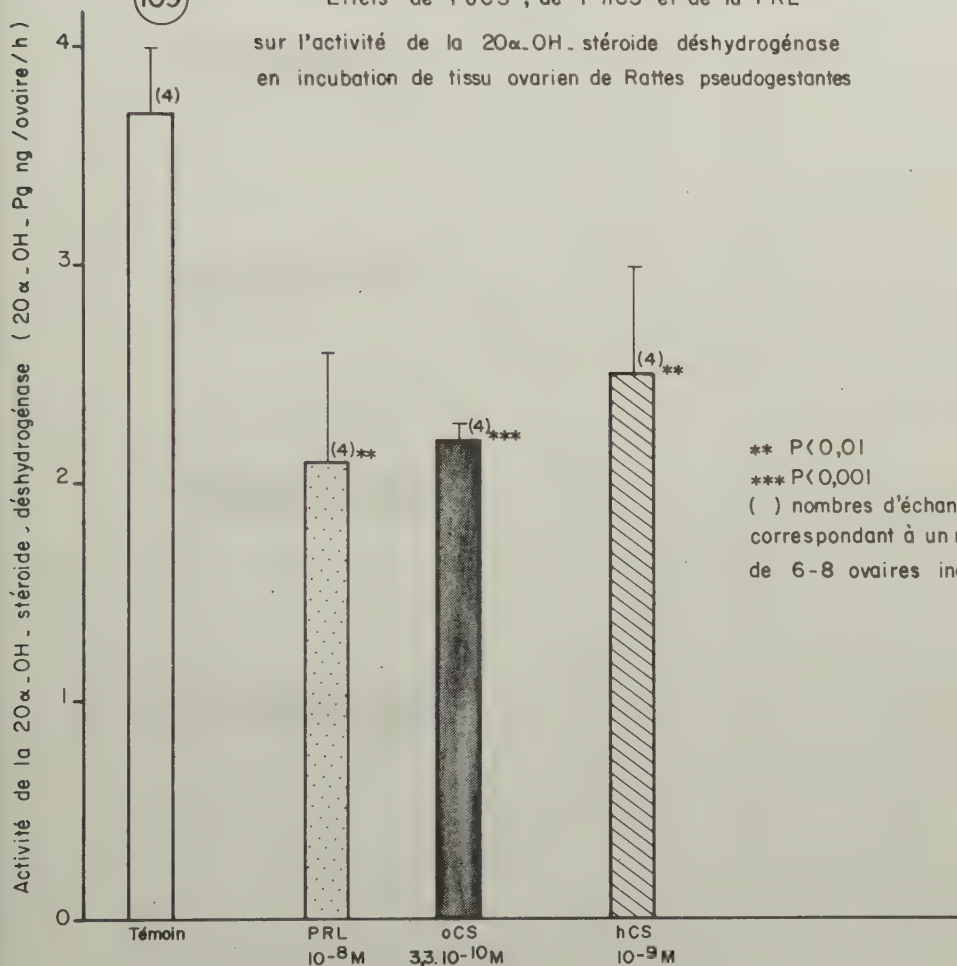
Effets de l'oCS, de l'hCS et de la PRL sur la concentration tissulaire de 20 α -OH-Pg en incubation de tissu ovarien de Rattes pseudogestantes



incubation de 3h à 37°C
 *** P < 0,001
 ** P < 0,01
 () nombre d'échantillons correspondant à un mélange de 6 - 8 ovaires incisés

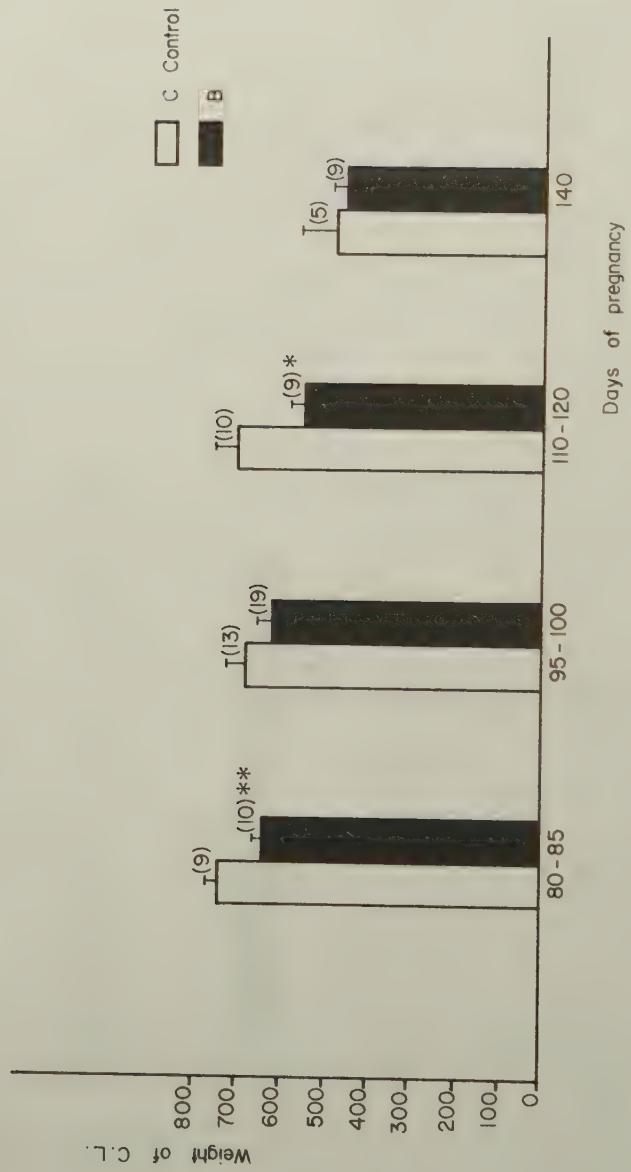
109

Effets de l'oCS , de l'hCS et de la PRL
sur l'activité de la 20 α -OH - stéroïde déshydrogénase
en incubation de tissu ovarien de Rattes pseudogestantes



** P<0,01
*** P<0,001
() nombres d'échantillons
correspondant à un mélange
de 6-8 ovaires incisés

Variations of pregnancy corpus luteum in bromocryptine (B) treated ewes



2. oCS et maintien du corps jaune gestatif chez la Brebis hypoprolactinémique (MARTAL et LACROIX, 1978, P19x)

L'évolution des structures lutéales a été étudiée chez des brebis gestantes traitées ou non par la bromocryptine. La Fig. 110 montre que du 80ème au 120ème jour de gestation, le poids des corps jaunes gestatifs de brebis hypoprolactinémiques est légèrement, mais significativement, ($P < 0,01$) inférieur à celui des animaux témoins. En moyenne, il n'a décréu que de 14 %. Ce n'est qu'à partir du 140ème jour de gestation que la lutéolyse est évidente dans les 2 groupes d'animaux. Nous avons vu au Chapitre VII que la bromocryptine à la dose de 2mg/jour/animal employée dans cette expérience n'affecte pas la concentration plasmatique d'oCS, alors que la prolactinémie est particulièrement réduite (environ 5ng/ml tout au long de la gestation des animaux traités). Ces expériences montrent donc que chez la Brebis, d'une part, la lutéolyse ne débute qu'à l'approche de la parturition, et, d'autre part, les concentrations sériques de prolactine, composant lutéotrophique hypophysaire, ne sont pas indispensables au maintien des structures lutéales à partir du 70ème jour de gestation. Puisque DENAMUR et coll., (1973) ont montré que la prolactine est nécessaire au maintien du corps jaune cyclique et du corps jaune gestatif jusqu'au 50ème jour, ces résultats suggèrent qu'à partir de cette date, une autre hormone, de type prolactinique, prend le relais de l'hormone hypophysaire. Il est très vraisemblable que cette hormone est l'oCS.

3. Mise en évidence d'une activité gonadotrophique chorionique chez la Brebis (oCG) (LACROIX et MARTAL, 1979, P27)

Le dosage radiorécepteur sur membrane de corps jaune de Brebis a permis de détecter dans les extraits placentaires, une substance qui entre en compétition avec l'hCG et la

Tableau XXIV

COMPARATIVE ASPECTS OF THE MAINTENANCE OF C.L. IN SHEEP

	Normal pregnant ewes		Recipient ewes			Donor ewes after removal of embryos at Day 21-23
			Treatment 0 (saline)	Treatment 1 (14-16-day homogenates)	Treatment 7 and 8 pH 9.6 supernatant	
Time of slaughter (Days after mating or oestrus)	15	60-90	17	23	50-60	70-110
No. of ewes	14	16	8	4	4	6
No. of CL (total)	34	19	0	4	9	11
Weight of CL (mg)	596 $\pm$ 28	620 $\pm$ 31	-	525 $\pm$ 32	409 $\pm$ 36	306 $\pm$ 38
Progesterone concentration (ng/ml)	4.7 $\pm$ 0.6	3.5 $\pm$ 0.7	0.6 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.5	4.9 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.9

Values are mean $\pm$ s.e.m.

LH, à la différence de l'oCS, de la prolactine ou de la GH. Différentes dilutions d'extrait placentaire (1/2 à 1/10) entraînent une diminution parallèle à la gamme étalon de la quantité d'oLH radioactive fixée aux récepteurs membranaires. Cette activité "LH like", apparemment spécifique, est détectable dès le 15ème jour de gestation à un taux de l'ordre de 0,17 UI par trophoblaste. Sa sécrétion est très faible et le niveau moyen est constamment d'environ 1 UI par gramme de tissu frais. La concentration placentaire maximale d'OCG (ovine Chorionic Gonadotropin) est d'environ 200 UI par placenta et est atteinte à partir du 80ème jour de gestation. Ce taux reste constant jusqu'à la parturition, date à laquelle l'OCG décroît rapidement pour atteindre 50 UI par placenta. L'OCG a également été trouvée dans le liquide amniotique. Néanmoins, en raison de l'interférence de facteurs sériques, cette hormone n'a pas pu être caractérisée dans le sang. Par ailleurs, elle ne présente aucune réaction immunologique croisée avec la LH ovine, la LH humaine et l'hCG dans les tests radioimmunologiques.

4. L'oCS n'est pas le facteur de signal embryonnaire de la gestation : mise en évidence de la trophoblastine (MARTAL et LACROIX, 1978, P21x ; MARTAL et coll., 1979, P24x ; MARTAL 1980, P28)

- a) Inhibition de la lutéolyse cyclique par des homogénats totaux de trophoblastes.

Quand des trophoblastes âgés de 14-16 jours homogénéisés dans du sérum physiologique (Traitement 1), sont injectés par voie intrautérine pendant 11 jours consécutifs, le comportement sexuel de 4 brebis sur 5 est inhibé jusqu'au 23ème jour, date à laquelle les animaux sont sacrifiés (Tableau XXV). Les corps jaunes (C.J.) identifiés sont bien vascularisés et leur poids moyen

Table XXV

EFFECT OF DAILY INTRAUTERINE INJECTIONS OF HOMOGENATES
OF EMBRYOS OR TROPHOBLASTS (FROM DAY 12) ON LUTEOLYSIS IN CYCLIC SHEEP

Nature	Treatment duration (days)	Total no. of injected trophoblasts or embryos	No. of recipient ewes	Next oestrus (days) (no. of ewes)	Progesterone concentration (ng/ml)
Saline (treatment 0)	11	-	8	16.9 $\pm$ 0.3 (8)	0.6 $\pm$ 0.1
14-16 day trophoblasts (treatment 1)	11	110	5	> 23 * (4)	2.7 $\pm$ 0.5
	4	56	7	16.7 $\pm$ 0.3 (3) > 58 * (4)	0.5 $\pm$ 0.1 1.9 $\pm$ 0.4
21-23 day embryos (treatment 2)	6	72	6	16.9 $\pm$ 0.3 (5)	0.2 $\pm$ 0.1
				> 53 * (1)	2.5 $\pm$ 0.2

Values are mean $\pm$ s.e.m.

* Slaughter at Day 23, 58, 53 of pregnancy
 ° serum progesterone concentration at Day of oestrus or of slaughter
 (three samples daily/animal)

($525 \pm 32\text{mg}$, $n = 4$), est comparable à celui des corps jaunes du 15ème jour de gestation ($596 \pm 28\text{mg}$, $n = 34$) (Tableau XXIV). Les valeurs de la progestérone sérique confirment que les C.J. étaient fonctionnels. Lorsque le traitement 1 est administré pendant 4 jours seulement, la lutéolyse cyclique n'est inhibée que chez 4 animaux sur 7 (Tableau XXV). Quand les 4 brebis sont sacrifiées au 58ème jour de gestation, les C.J. sont comparables en poids ($454 \pm 30\text{mg}$, $n = 4$), et en activité, à ceux des animaux traités pendant 11 jours. Ni la présence de cathéter, ni l'injection de sérum physiologique (Traitement 0) n'entraînent de prolongation du cycle oestral (Tableau XXV). Cependant, si la pénicilline est omise, un début d'infection inhibe la lutéolyse, comme cela a déjà été observé par COUDERT et SHORT (1966).

b) Nature de la substance antilutéolytique

La lutéolyse cyclique n'est pas bloquée par les Traitements 3 ou 4 (Tableau XXVI), ce qui suggère que la trophoblastine est vraisemblablement une protéine ou est incluse dans du matériel protéique. Des injections intrautérines d'hCG (Traitement 9) n'ont pas d'effet sur la régression du corps jaune cyclique (Tableau XXVI) qui a été soigneusement marqué à l'encre de Chine car de nouveaux C.J. peuvent être formés sous l'influence d'hCG. De même, le traitement par l'oCS (Traitement 10) à des concentrations présumées 40 fois supérieures aux concentrations physiologiques du début de gestation, (MARTAL et DJIANE, 1977, P14x) ne maintient pas les structures lutéales des brebis receveuses (Tableau XXVI). La trophoblastine paraît donc être une protéine différente de l'oCS et de la gonadotrophine chorionique humaine. Lorsque des extraits bruts de placentas au 120ème jour de gestation, qui contiennent de grandes quantités d'oCS, sont injectés (Traitement 11), les mêmes résultats négatifs sont obtenus, suggérant que la

Table XXVI THE EFFECTS OF VARIOUS TREATMENTS (DAYS 12-17) ON INHIBITION OF LUTEOLYSIS IN EWES TO SHOW THE NATURE OF TROPHOBLASTIN

Treatment	Daily amount/ewe	N° of ewes	Interval to next oestrus* (days) (N° of ewes)
1 (14-16-day homogenates)	2 trophoblasts	12	> 22* (8) 16,9 ± 0,4 (4)
3 (14-16-day homogenates heated)	2 trophoblasts	3	17,2 ± 0,2 (3)
4 (pronase alone)	2 mg	4	16,7 ± 0,3 (4)
4 (pronase + homogenates)	2 mg + 2 trophoblasts	3	17,3 ± 0,3 (3)
9 (hCG)	15 i.u.	4	16,7 ± 0,4 (4)
	1500 i.u.	4	16,2 ± 0,3 (4)
10 (oCS)	prolactin equiv.	5	17,2 ± 0,2 (5)
11 120 day placenta	2 ml	3	16,5 ± 0,1 (3)

Values are mean ± s.e.m.

* progesterone concentration in peripheral serum at moment of oestrus was 0.4[±] 0.1 ng/ml (N=30)
 , slaughter at day 23 or 58 of pregnancy

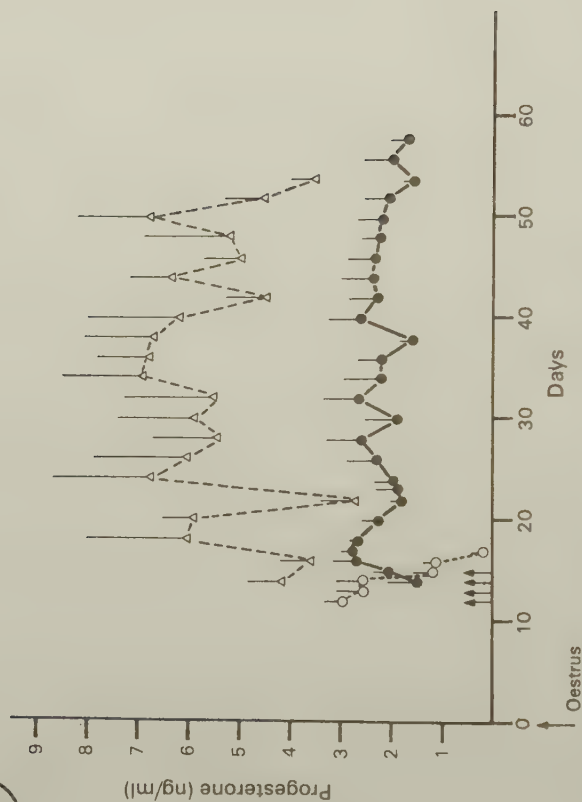
Table XXVII

THE EFFECT OF VARIOUS EXTRACTION PROCEDURES FOR TROPHOBLASTIN
ON THE INHIBITION OF LUTEOLYSIS IN SHEEP

N°	Treatment (days 12-22)			Number of ewes returning to oestrus Number treated	Interval to next oestrus (days)
	pH of extraction	Fraction	N° of 14-16 day trophoblasts injected		
5	7	Pellet	30	1/1	19
		Supernatant	30	3/3	16.0 $\pm$ 0.3
6	8	Pellet	20	1/1	21
		Supernatant	20	1/1	18
7	9,6	Pellet	60	3/3	16.8 $\pm$ 0.2
		Supernatant	60	2/5	16.2 > 30 *
8	9,6	ultrogel effluent	90	1/3	17 > 30 *

Values are mean $\pm$ s.e.m.

* Slaughtered at day 37 (1 ewe), 54 (3 ewes), 58 (1 ewe)



Progesterone concentrations (mean $\pm$ s.e.m.) in the peripheral serum of recipient ewes after the intrauterine injections of homogenates and extracts of trophoblasts. ●—●, Injections (t) to 4 ewes over 4 days of homogenates of 14–16-day trophoblasts; ○—○, injections to 5 ewes over 6 days of homogenates of 21–23-day embryos; △—△, injections to 3 ewes over 6 days of extracts at pH 9.6 of 14–16-day trophoblasts.

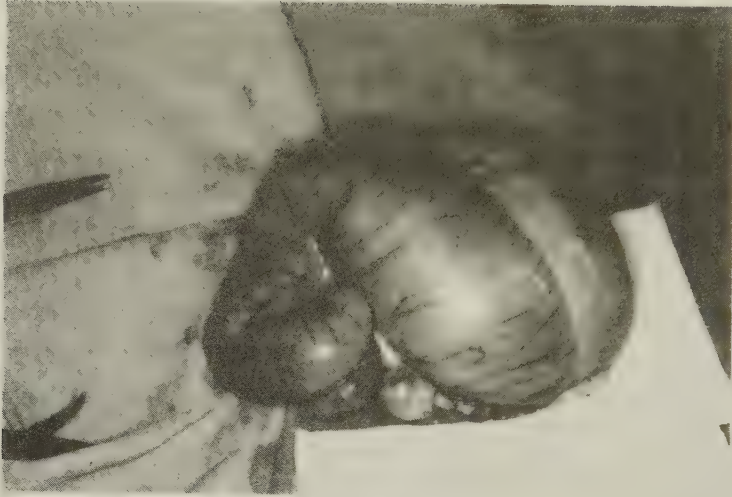
trophoblastine a disparu du placenta à ces périodes tardives de gestation (Tableau XXVI). Les traitements 5 et 6 (extraits à pH 7 et 8) n'ont pas d'effet inhibiteur sur la lutéolyse, mais les traitements 7 et 8 (extraits à pH 9,6), bloquent la régression des structures lutéales chez quelques animaux (Tableau XXVII). La présence d'activité antilutéolytique dans les filtrats de colonnes d'Ultrogel démontre que les cellules trophoblastiques ne sont pas nécessaires pour inhiber la régression du corps jaune et que le facteur est soluble.

c) Durée de la synthèse de la trophoblastine

L'injection d'homogénats d'embryons âgés de 21-23 jours (Traitement 2) n'empêche pas la régression lutéale dans 5 cas sur 6 (Tableau XXV, Fig. 111). La trophoblastine semble donc être absente ou presque, à ce stade de gestation. La trophoblastine apparaît être sécrétée en quantité appréciable du 12ème aux 21-23èmes jours de gestation.

d) Persistance de l'action de la trophoblastine sur la lutéolyse cyclique

Après les injections intrautérines de trophoblastes de 14-16 jours, durant 4 jours, les corps jaunes sont maintenus pendant presque 2 mois chez 4 brebis sur 7, (Tableau XXV, Fig. 111). Les niveaux de progestérone restent constants à environ 2ng/ml. L'utérus apparaît distendu contenant environ 100ml d'un liquide clair, jaunâtre et stérile, de composition non encore identifiée (Fig. 112). La muqueuse utérine apparaît saine et le liquide ne présente aucune ressemblance avec celui d'un pyomètre. Lorsque les brebis reçoivent par voie intrautérine des homogénats de trophoblastes extraits à pH 9,6 (Traitement 7 et 8), la progestérone est sécrétée à des niveaux supérieurs à 4ng/ml pendant plus de 1 mois (Fig. 111), alors que le poids des corps jaunes



a) Utérus distendu par un liquide clair , inodore et stérile



b) Aspect de la muqueuse utérine après incision

TRACTUS GENITAL DE BREBIS "PSEUDOGESTANTE"

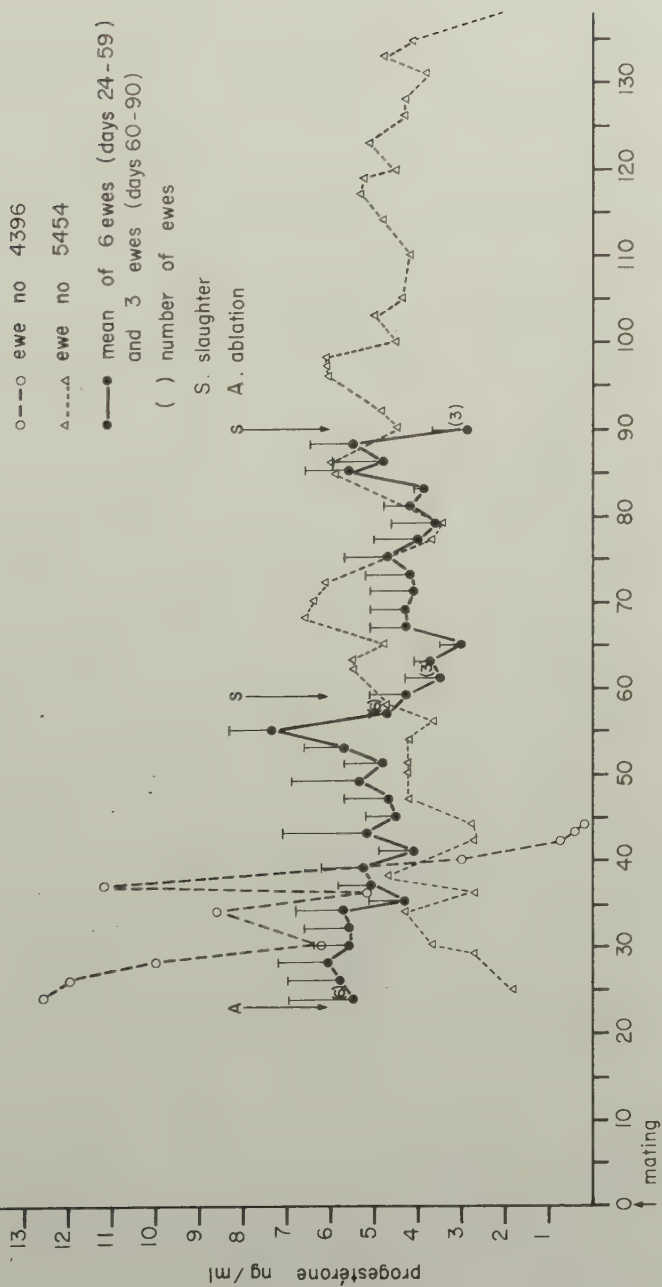


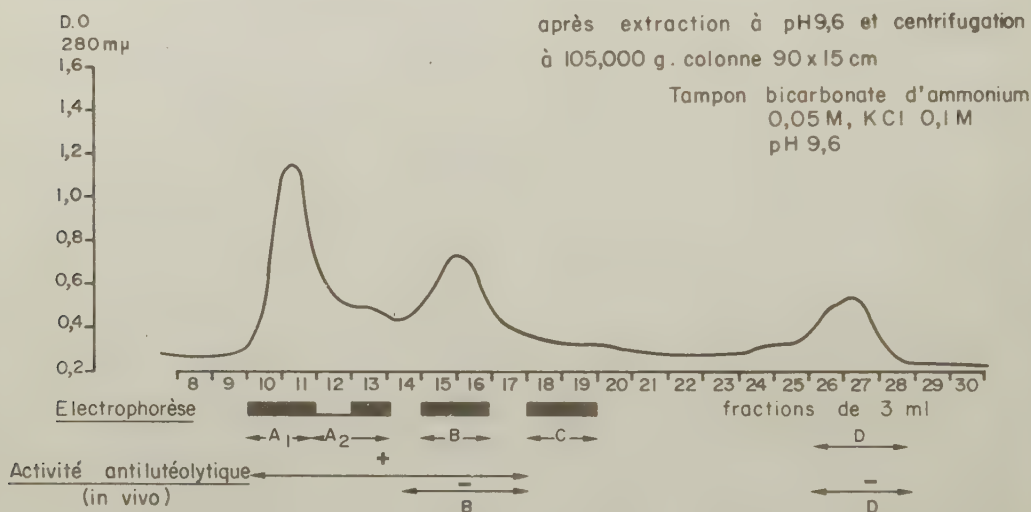
Table xxviii

PERSISTENCE OF THE INHIBITION OF LUTEOLYSIS AFTER ABLATION
OF 21-23 DAY-EMBRYOS

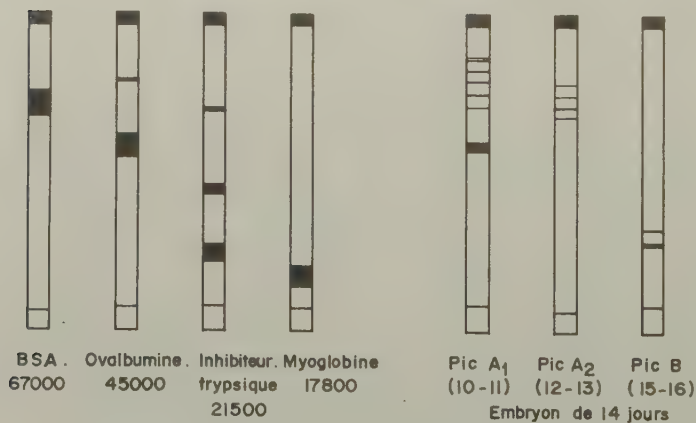
	ABLATION OF 21-23 DAY EMBRYOS	MAINTENANCE (DAYS) OF THE CORPUS LUTEUM AFTER SURGERY		
		10-20	30-60	70-110
NUMBER OF EWES	26	12	7	7

est inférieur à celui des brebis du Traitement 1, abattues plus tôt (Tableau XXIV). Aucun follicule lutéinisé ou C.J. nouvellement formé, n'est observé. La concentration de progestérone, particulièrement forte dans cette expérience, peut être attribuée à la fréquence élevée de 2 corps jaunes chez ces brebis. L'utérus contient encore un liquide abondant, jaunâtre, dont l'analyse bactériologique ne révèle aucun germe pathogène aérobie ou anaérobie. L'ablation d'embryons âgés de 21-23 jours à partir de 26 brebis donneuses dont le C.J. est marqué et les niveaux de progestérone déterminés, provoque un retard important du retour en oestrus de certains animaux : l'oestrus a lieu entre 10 et 20 jours après l'opération chez 12 brebis, entre 30 et 60 chez 7 et 70-110 jours chez 7 autres animaux (Tableau XXVIII). L'ablation d'embryons à 14-16 jours de gestation n'empêche pas le retour en oestrus quoique le cycle oestral soit légèrement prolongé, comme l'ont observé MOOR et ROWSON (1966 b) et EDEY (1967). Les concentrations de progestérone chez les animaux privés de leurs embryons à 21-23 jours de gestation sont présentées Fig. 113. La progestéronémie moyenne de 6 brebis est de 4 à 6ng/ml jusqu'au 69ème jour après l'opération. Des concentrations individuelles de progestérone sérieuses sont également présentes chez quelques brebis : par exemple, chez la brebis 4396, le C.J. régresse rapidement (23 jours après l'opération) alors que chez la brebis 5454, la lutéolyse a lieu fort tard, au 112ème jour après l'opération. Le comportement sexuel des animaux confirme rigoureusement ces données. A l'abattage, entre 70 et 110 jours après l'opération, le C.J. est encore bien développé et les niveaux sériques de progestérone sont assez élevés (Fig. 113, Tableau XXIV). L'utérus de la plupart des brebis est distendu par du liquide mais on sait que la distension artificielle de l'utérus n'est pas suffisante pour bloquer la lutéolyse (MOOR, 1968). Lorsque des homogénats d'embryons de 21-23 jours sont injectés par voie intrautérine (Traitement 2) à des brebis receveuses, l'une d'entre elles

114 Fractionnement d'homogénats de trophoblastes de 14 jours sur Ultrogel AcA 44



115 Electrophorèse en gels de polyacrylamide - SDS de fractions d' Ultrogel d'homogénats de trophoblastes de 14 jours

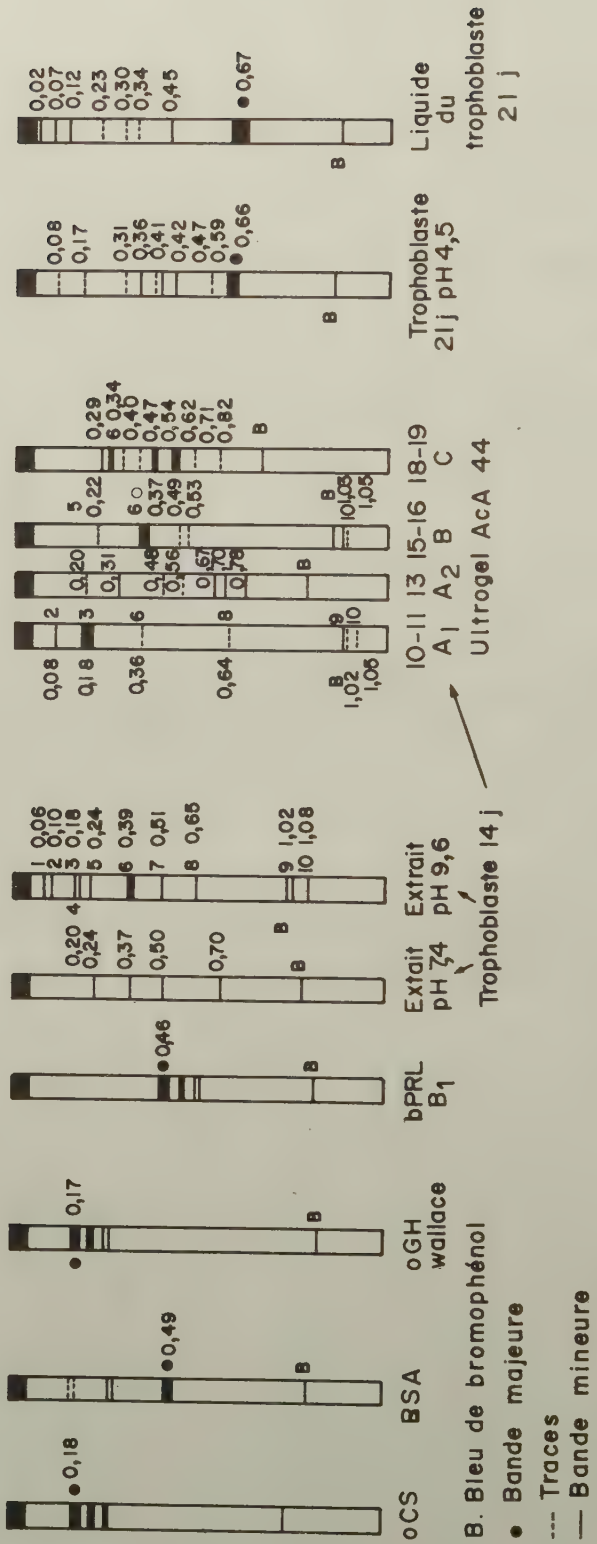


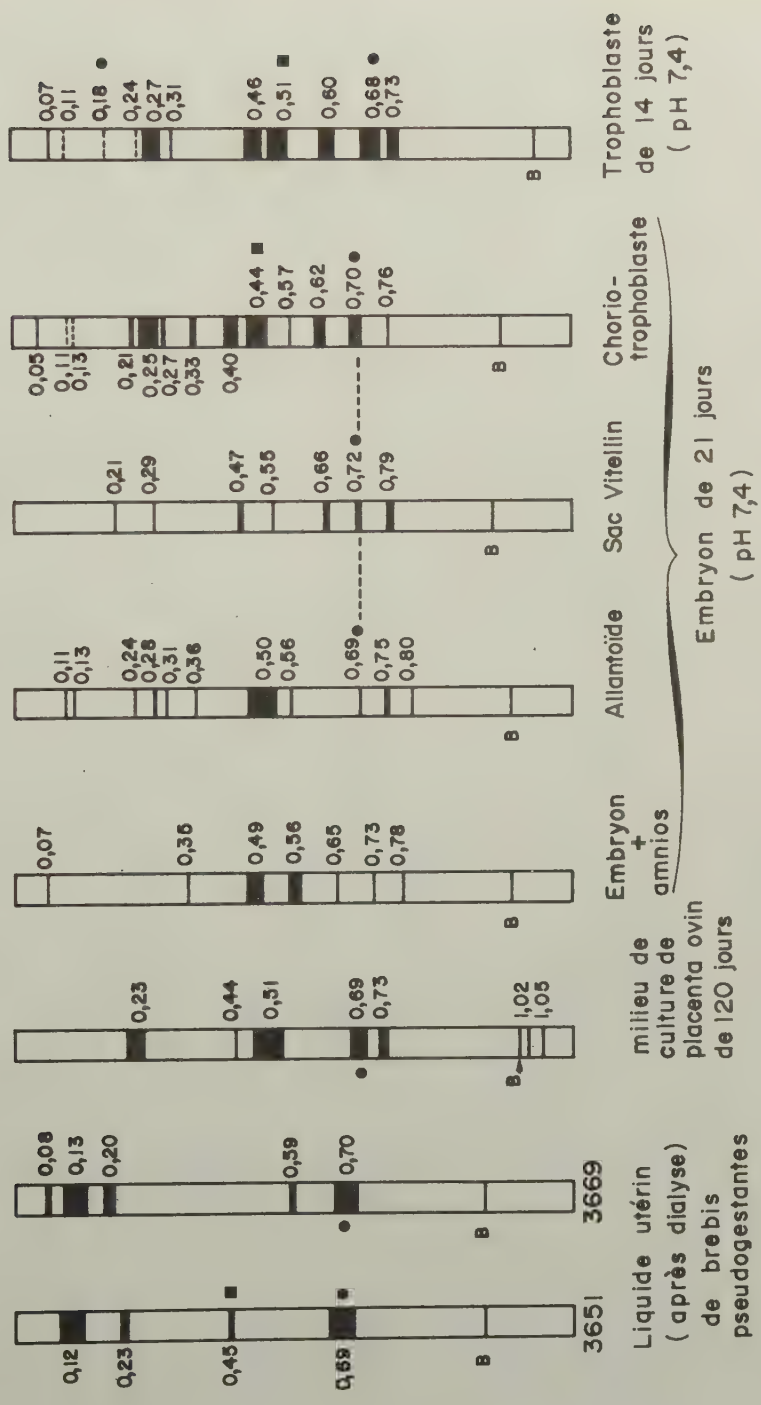
présente un corps jaune bien vascularisé, pesant 554mg à l'abattage à 53 jours (Tableau XXV). La concentration de progestérone dépasse 2ng/ml et confirme l'état fonctionnel du C.J. Les 5 brebis restantes montrent un comportement sexuel et une progestéronémie normaux (Fig.111). Enfin, 1 cas apparent de "pseudogestation naturelle" est observé à 14 jours de gestation chez l'une des brebis "donneuse d'embryon", l'utérus de cet animal est dépourvu de trophoblaste mais distendu par un liquide clair et stérile. Cependant, la présence de débris de membranes suggère qu'une résorption embryonnaire peut avoir eu lieu. La progestéronémie dépasse 2ng/ml jusqu'au retour en chaleur, le 82ème jour. Au cours de multiples situations expérimentales apparentées à des pseudogestations, nous avons vu que lorsque la lutéolyse cyclique a été bloquée, en présence des hormones lutéotrophiques hypophysaires, le corps jaune est capable de se maintenir partiellement pendant un temps assez variable, et que son poids reste toutefois nettement inférieur à celui observé chez l'animal gestant normal.

e) Analyse comparative préliminaire des profils électrophorétiques des liquides utérins et des divers constituants trophoblastiques

Après fractionnement d'extraits à pH 9,6 de trophoblastes âgés de 14 jours sur colonne d'Ultrogel (Fig. 114), l'injection simultanée à des brebis receveuses du matériel contenu dans les pics d'élution A_1 , A_2 et B montre que ceux-ci renferment une activité antilutéolytique, (Tableau XXVII). En revanche, le pic B, injecté seul ne produit pas d'inhibition de la lutéolyse. Le pic D correspond vraisemblablement à la fraction nucléotidique comme le montre le rapport des valeurs d'absorbance à 280 et 260 nm. Les fractions A_1 , A_2 et B sont analysées par électrophorèse sur gels de polyacrylamide - SDS (Fig. 115). 2 protéines d'environ 20-25000 daltons sont visibles dans le pic B, le pic A_2 contient 4 bandes dont 3 sont déjà présentes dans le pic A_1 . Le pro-

Electrophorèse sur gels de polyacrylamide (Ornsstein - Davis)
de fractions d'homogénats de trophoblastes de 14 jours après Ultrogel Aca 44





ETUDE COMPARATIVE PRELIMINAIRE DES PROTEINES UTERINES ET EMBRYONNAIRES
PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRILAMIDE

Tableau XXIX

Mobilité relative	Liquide utérin	Cotylédon placentaire de 120 jours (jonction chorion-endo-maternal-)	Trophoblaste de 14 jours	Choriotrophoblaste de 21 jours	Liquide du trophoblaste de 21 jours	Allantoïde (21j)	Embryon + amnios (21j)
0,02					+		
0,07	+		+	+	+		+
0,11			+	+		+	
0,13	+++			+	+	+	
0,18			+++ (pH 9,6)	± (pH 4,5)			
0,20	+		+	+			
0,25	+	+++	+	+++	+	+	
0,27			++	+	+	+	
0,37			+++ (pH 9,6)	++	+	+	+
0,40				++		+	
0,45	++	+	++	+++	+	++	++
0,55	++	+++	++	+		+	++
0,69	+++	+++	++	++	+++	+	+
0,73		+	+	++		+	+
0,78				+		+	+
1,02		+	+			+	
1,05		+	+			+	

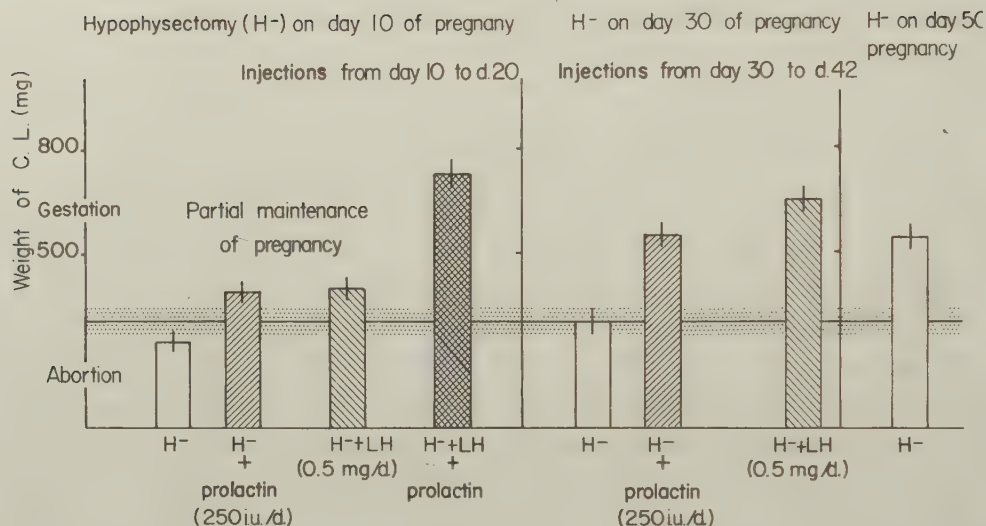
+++ bande principale
le nombre de + est proportionnel à la quantité de protéine

-fil du pic A₁ présente 6 protéines mineures de poids moléculaire élevé (supérieur ou égal à celui de la sérumalbumine) et une protéine majeure d'environ 45000 daltons. En électrophorèse sur gels de polyacrylamide non dénaturants (méthode ORNSTEIN-DAVIS), ces divers pics d'Ultrogel présentent (Fig. 116), une plus grande complexité. Il existe 3 bandes majeures de mobilité relative 0,18, 0,37, 0,62, (par rapport au Bleu de Bromophénol) et diverses bandes mineures dont certaines ne sont qu'à l'état de traces. Les protéines de mobilité 0,18 et 0,62 ont été considérablement enrichies lors du fractionnement sur Ultrogel. La mobilité relative de ces diverses protéines est comparée à celle de l'oCS, de la sérumalbumine bovine, de la prolactine bovine et de l'hormone de croissance ovine. Bien que l'oCS ait un Rf de 0,18, la protéine présentant une mobilité relative identique et effluant de la colonne d'Ultrogel dans la zone des composés à poids moléculaire élevé, ne peut être assimilée à l'oCS puisque cette hormone serait éluee après le pic B et qu'aucune de ses activités ne peut être mise en évidence à ce stade gestatif.

Les extraits pH 7,4 de trophoblastes de 14 jours ne présentent pas cette bande de Rf 0,18 (Fig. 116) ou qu'à l'état de traces (Fig. 117). Le point isoélectrique de cette protéine pourrait donc se situer, comme celui de l'oCS et de l'OGH, près de la neutralité. La bande majeure (PM 45000) observée en électrophorèse sur gels de polyacrylamide - SDS (Fig. 115) pourrait correspondre à la protéine majeure de mobilité relative 0,18 observée en gel non dénaturant (Fig. 116), ou à l'un de ses monomères. Enfin, l'analyse comparative préliminaire de la mobilité relative des protéines embryonnaires (au sens large : trophoblastes, embryons et diverses enveloppes) et des protéines du liquide utérin de brebis pseudogestantes qui ont reçu des homogénats de trophoblastes de 14 jours montre que la protéine majeure de mobilité relative 0,18 est uniquement abondante

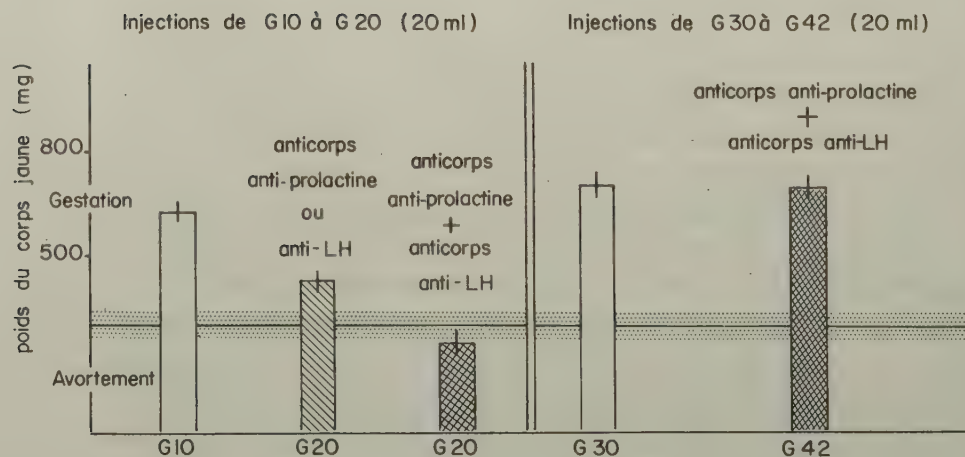
118

Hypophysectomised pregnant ewes
(according to DENAMUR and MARTINET)



119

Brebis gestantes intactes
(d'après KANN et DENAMUR)



dans les extraits pH 9,6, de trophoblaste de 14 jours (Tableau XXIX). En conséquence, si la trophoblastine est une protéine détectable électrophorétiquement (sensibilité d'environ 5 μ g) dans les extraits pH 9,6 de trophoblastes de 14 jours, elle pourrait correspondre à la protéine de mobilité relative 0,18.

DISCUSSION

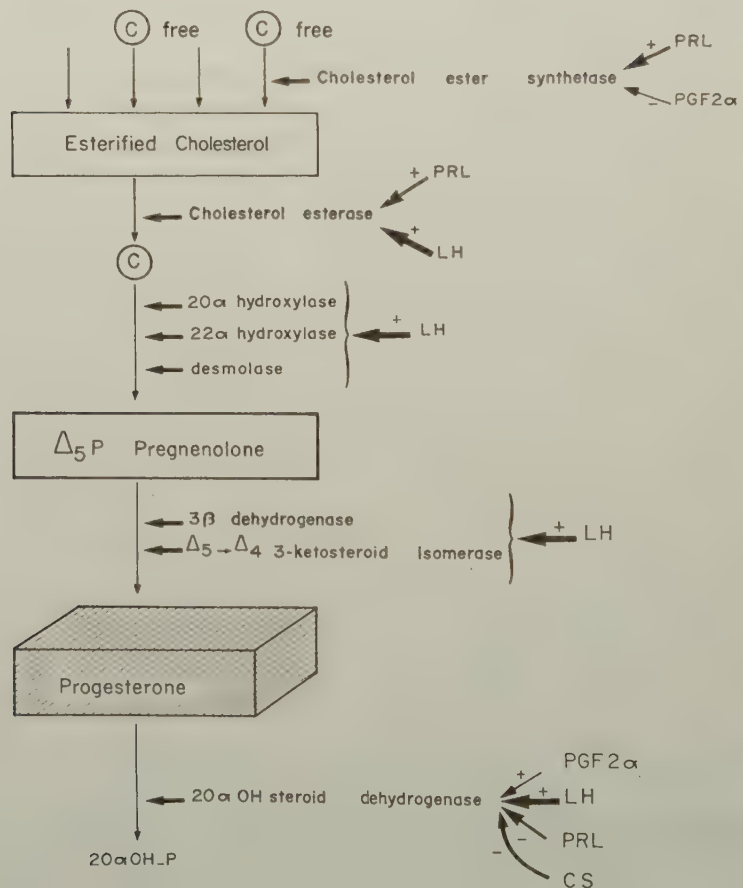
1. Les lutéotrophines placentaires

Avant le 50ème jour de gestation, l'hypophysectomie, chez la Brebis, provoque l'arrêt rapide de la sécrétion de progestérone, la régression du corps jaune et l'avortement, (DENAMUR et MARTINET, 1961). Lorsque l'hypophysectomie est pratiquée le 10ème jour de gestation, la supplémentation en prolactine (250 UI/jour) ou en LH (0,5mg/jour), du 10ème au 20ème jour, ne permet le maintien de la gestation que pendant une courte période alors que l'association de ces deux hormones (aux mêmes doses) empêche l'avortement et entraîne un développement normal des structures lutéales (DENAMUR, 1973), (Fig. 118). De plus, chez la Brebis gestante non hypophysectomisée, l'injection d'anticorps anti-LH ou anti-prolactine, du 10ème au 20ème jour, permet le maintien temporaire de la gestation alors que l'association des deux antisérums provoque l'avortement (KANN et DENAMUR, 1974) (Fig. 119). Bien que l'oCS et l'oCG soient sécrétées dès le 16ème jour de gestation, ces hormones ne permettent donc pas le maintien du corps jaune avant le 20ème jour. L'association de la LH et de la prolactine hypophysaire semble être essentielle à l'établissement de la gestation chez la Brebis. Néanmoins, les concentrations plasmatiques de LH et de prolactine ne varient pas significativement durant les stades précoces de gestation

(DENAMUR, 1973 ; KANN et DENAMUR, 1974) et de très faibles taux de ces deux hormones suffisent à maintenir une activité sécrétoire du corps jaune comme le montrent les expériences de déconnection hypothalamo-hypophysaire (DENAMUR et MARTINET 1961 ; ADAMS et coll., 1963 ; BRYANT et coll., 1971 ; KANN et DENAMUR, 1974). En revanche, si l'hypophysectomie pratiquée au 30ème jour de gestation provoque encore l'avortement, il suffit d'administrer, à partir de cette date, soit de la prolactine, soit de la LH pour permettre le maintien du corps jaune et par suite de la gestation (DENAMUR, 1973) (Fig. 118). De plus, l'association d'anti-corps anti-LH et antiprolactine n'est plus suffisante pour provoquer la régression du corps jaune gestatif et l'avortement (Fig. 119). L'hypophysectomie de brebis à partir du 50ème jour de gestation conduit à une diminution de seulement 25 % du poids du corps jaune (DENAMUR et coll., 1971) (Fig. 118) et nous avons vu que l'administration de bromocryptine, qui supprime presque complètement la prolactine sérique (Chapitre VII), n'entraîne qu'une régression d'environ 15 % des structures lutéales (Fig. 110) (MARTAL et LACROIX, 1979, P19x). Puisque le corps jaune gestatif reste normalement fonctionnel (FEVRE, 1967 ; MOOR et ROWSON, 1969) jusqu'à la fin de la gestation (MARTAL et DJIANE, 1977, P14x ; MARTAL et LACROIX, 1979, P19x), l'ensemble des expériences ci-dessus implique l'existence d'hormones lutéotropes d'origine placentaire ayant des activités analogues à celles de la LH et de la prolactine : l'oCG et l'oCS, que nous avons mis en évidence, répondent bien à ces propriétés. Leur apparition précoce et leur présence tout au long de la gestation suggèrent leur intervention dans le maintien des structures lutéales. Le maintien seulement partiel des corps jaunes de brebis pseudogestantes, donc, en absence de placenta et en présence de lutéotrophines hypophysaires, est encore en faveur de l'existence d'hormones lutéotrophiques d'origine placentaire dont l'action serait complémentaire de celles de la trophoblastine, de la LH, et de la prolactine pour maintenir des structures lutéales normales de gestation. Bien qu'à

partir du 50ème jour, le corps jaune ne soit pas indispensable au maintien de la gestation, sa sécrétion de progestérone sert probablement d'appoint à la sécrétion de progestérone placentaire. D'ailleurs, même dans l'espèce humaine (TULSKY et KOFF, 1957) où l'ovariectomie peut être pratiquée très précocément, il est souvent nécessaire, en Clinique, d'administrer de la progestérone pour permettre l'évolution normale de la grossesse. Nous ne reviendrons pas ici sur les très nombreuses analogies que nous avons mises en évidence au cours des chapitres précédents, entre l'OCS et la prolactine. L'activité hCG-like que nous observons dans le placenta de Brebis au moyen d'un dosage radiorécepteur spécifique avec des membranes de corps jaunes ovins, est très faible, mais l'existence d'une gonadotrophine chorionique ovine (oCG) est en accord avec les faits suivants : WINTENBERGER-TORRES (1978) utilisant une technique analogue, a trouvé une faible activité LH-like dans le milieu de culture de trophoblastes ovins âgés de 10 à 13 jours. Chez la Lapine, (HAOUR et SAXENA, 1974) et chez la Ratte, (HAOUR et coll., 1976), la concentration placentaire d'activité hCG-like est également très peu élevée. En revanche, BLANK et coll., (1979) viennent de parvenir à mettre en évidence une très forte activité sérique hCG-like chez la Ratte. Chez la Femme, (JAFTE et coll., 1969 ; YOSHIMI et coll., 1969 ; CATT et coll., 1975) l'hCG, qui a été purifiée et caractérisée, est abondante dans le sérum des premières semaines de grossesse. Il en est de même pour le Singe (NEILL et KNOBIL, 1972 ; NIXON et coll., 1972 ; HODGEN et coll., 1975). Bien que le rôle des gonadotrophines chorioniques soit encore mal connu, ces hormones pourraient jouer un rôle dans le contrôle de la sécrétion de la progestérone placentaire. La LH permet, en effet, de stimuler in vitro la sécrétion de progestérone par les cotylédons foetaux de Brebis (KOLIGIAN et STORMSHAN, 1976). En raison du rôle complémentaire de la LH et de la prolactine, d'une part, et celui de l'oCG et de l'OCS d'autre part, dans le contrôle de la sécrétion de la progestérone par le corps jaune, l'OCS pourrait également participer au contrôle de la synthèse de cette hormone dans le placenta.

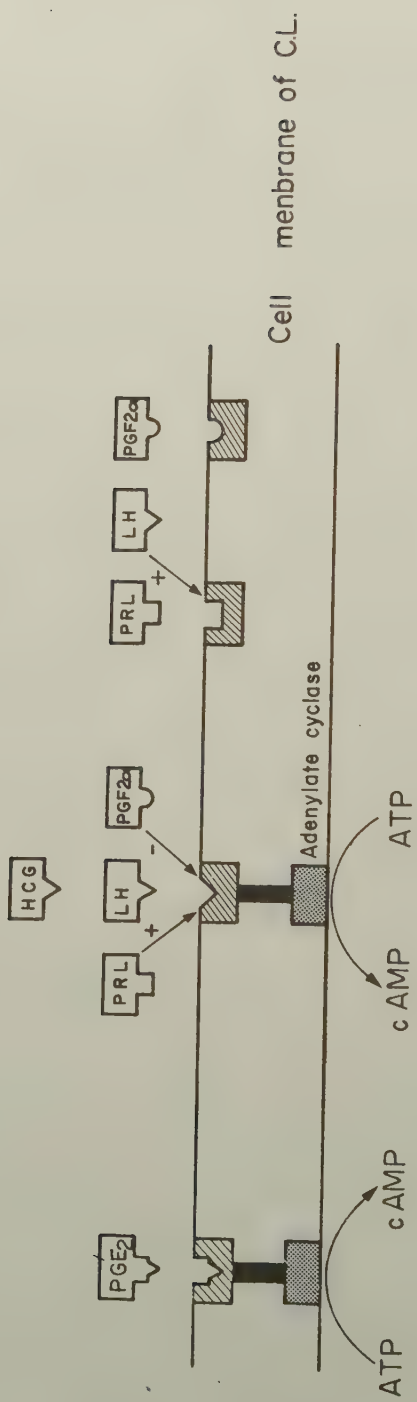
120 Mechanism of action of luteotrophic and luteolytic hormones during steroidogenesis



2. Mécanismes d'action des lutéotrophines

Nous avons montré que l'oCS, l'hCS et la prolactine sont capables de diminuer la dégradation de la progestérone dans le tissu lutéal de Ratte en inhibant l'activité de la 20α -OH - stéroïde déshydrogénase. En raison du rapport Progestérone/ 20α -OH - progestérone très élevé (≈ 50) chez la Brebis (C. HERMIER, communication personnelle) il est très difficile d'étudier in vitro, sur du tissu ovin en survie, l'effet de ces hormones sur le catabolisme de la progestérone et ceci explique que nous ayons utilisé un système hétérologue. Néanmoins, la 20α -OH - Progestérone est le principal catabolite de la progestérone chez la Brebis (SHORT et MOORE, 1959). Il est donc raisonnable d'envisager une action lutéotrophique de l'oCS au niveau de la 20α -OH - stéroïde déshydrogénase. Chez la Ratte, la prolactine inhibe également le catabolisme de la progestérone en 20α -OH - progestérone à la fois in vivo (WIEST et coll., 1968) et in vitro (DE LA LLOSA-HERMIER et coll., 1979) (Fig. 120). En réalité, ce mode d'action des hormones lactogènes placentaires et de la prolactine s'inscrit dans un ensemble de mécanismes de régulation de la fonction lutéale qui permet de mieux comprendre les résultats précédents. Des récepteurs à la prolactine ont été mis en évidence au niveau du corps jaune de Vache par SAITO et SAXENA (1974) mais ils n'ont pas été caractérisés, à notre connaissance. Chez le Rat, la LH stimule la synthèse des récepteurs prolactiniques du tissu lutéal (Fig. 121) (HOLT et coll., 1976 ; RICHARDS et WILLIAMS, 1976). Au niveau de la stéroïdogénèse, la prolactine stimule le turn-over du cholestérol en activant, d'une part, la cholestérolestersynthétase qui permet d'augmenter le stockage et la cholestérolestérase qui transforme le cholestérol estérifié en cholestérol libre, utilisable pour la biosynthèse de la progestérone, (Fig. 120). Chez le Rat hypophysectomisé, l'administration de prolactine suffit à maintenir, à la fois, les structures lutéales et la sécrétion de progestérone (BEHRMAN et coll., 1971 a).

Heteroregulation of number of LH and PRL receptors in the rat



Néanmoins, à l'inverse de la LH ou de l'hCG, la prolactine n'a pas d'effet in vitro sur la biosynthèse proprement dite, de la progestérone dans le corps jaune de Brebis (KALTENBACH et coll., 1967) et de Ratte (ARMSTRONG et coll., 1970) (Fig. 120). Là est sans doute la limite essentielle de l'action lutéotrophique de la prolactine et des hormones lactogènes placentaires. Cependant, bien que la LH soit la véritable hormone stéroïdogène parce qu'elle favorise la biosynthèse proprement dite de la progestérone, son action n'est toutefois possible in vitro à partir de corps jaunes de Ratte hypophysectomisée que si les animaux ont reçu, in vivo, de la prolactine (ARMSTRONG et coll., 1970). Puisque les équilibres endocriniens responsables du maintien des structures lutéales sont identiques chez la Ratte et chez la Brebis, il est raisonnable d'admettre que les mécanismes impliqués dans le contrôle de la synthèse et de la dégradation de la progestérone sont analogues dans ces deux espèces. Signalons encore que chez la Ratte la prolactine est capable d'inhiber la réduction des récepteurs à la LH provoquée par la prostaglandine F2 α (PGF2 α) (HICHENS et coll., 1974 ; GRINWICH et coll., 1976) (Fig. 121). La prolactine augmente d'ailleurs directement le nombre des récepteurs à la LH chez la Ratte (HOLT et coll., 1976 ; RICHARDS et WILLIAMS, 1976). Ces deux hormones, LH et prolactine, constituent donc au niveau du tissu lutéal un excellent exemple d'hétérorégulation (Fig. 121). En conclusion, la prolactine paraît néanmoins nécessaire à la mise en réserve du cholestérol dans la cellule lutéale. Cette hormone est capable, à elle seule, de prolonger l'action de la LH sur la sécrétion de la progestérone et même de l'amplifier en inhibant la dégradation de celle-ci (HOLT et coll., 1976). Vu l'identité d'action de la prolactine et de l'oCS au niveau du catabolisme de la progestérone, il est probable que ces deux hormones interviennent de manière identique au niveau des autres étapes du contrôle de la progestérone. L'ensemble de ces mécanismes d'action est résumé sur la Fig. 120. Bien que la caractérisation de la gonadotrophine chorionique ovine (oCG) reste encore rudimentaire, sa fixation sur

les récepteurs à la LH du tissu lutéal, ovin ou bovin, suggère qu'elle présente des mécanismes d'action comparables à ceux de la LH et de l'hCG. Au niveau de la stéroïdogénèse, la LH n'active pas la cholestérolestersynthétase, mais active la cholestérolestérase (BEHRMAN et coll., 1971 a) (Fig. 120). Elle est capable de stimuler les différentes étapes de la biosynthèse de la progestérone in vivo et in vitro (ARMSTRONG et coll., 1964 ; SAVARD et coll., 1965 ; BEHRMAN et coll., 1971 a ; HERMIER et coll., 1972). En revanche, la LH favorise, comme la PGF 2α , la dégradation de la progestérone en stimulant l'activité de la 20α - OH - stéroïde déshydrogénase, à l'inverse des hormones lactogènes (WIEST et coll., 1968 ; BEHRMAN, 1971 a). On sait, de plus, qu'à la différence de la prolactine, l'hCG et la LH stimulent l'activité de l'adénylatecyclase (MARSH et coll., 1966 ; MARSH, 1970 ; MASSON et coll., 1973 ; HERLITZ et coll., 1974). L'AMP cyclique formée permet l'activation de protéine-kinases (MENON, 1973 ; AZHAR et MENON, 1975 a). Un type de protéine-kinase AMPc dépendante est notamment impliquée dans le clivage de la chaîne latérale du cholestérol pour former la prégnénolone (CARON et coll., 1975).

3. Nature de la trophoblastine, facteur de signal embryonnaire d'inhibition de la lutéolyse

A 14-16 jours de gestation, le disque embryonnaire de Brebis n'est qu'un amas cellulaire de quelques centaines de μm de diamètre alors que le trophoblaste est environ cinquante fois plus développé (Fig. 67, Chapitre VIII) (WINTENBERGER-TORRES, 1967 ; BINDON, 1973 ; FLECHON et coll., 1978). Par sa morphologie très allongée, le trophoblaste semble particulièrement bien adapté à son action antilutéolytique locale. Il n'est donc pas déraisonnable de considérer que la trophoblastine est sécrétée par le trophoblaste proprement dit plutôt que par le disque embryonnaire. L'effet antilutéolytique du trophoblaste ne dure que pendant une période restreinte : la trophoblastine semble présente à partir du 12^{ème} jour (premier jour des injections intrautérines) et disparaître à 21-23 jours. Nous avons vu que les injections d'OCS,

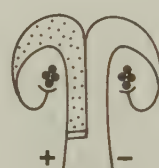
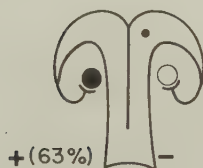
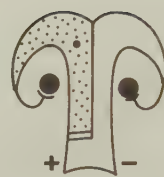
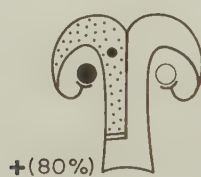
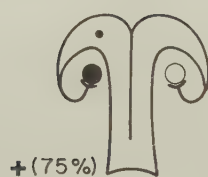
d'hCG et d'extraits placentaires à 120 jours n'inhibent pas la lutéolyse cyclique, ce qui implique notamment que la trophoblastine n'est ni l'oCS ni l'oCG. Nous avons montré comme ROWSON et MOOR (1967) que l'activité de la trophoblastine est thermolabile. De plus, son action antilutéolytique disparaît après incubation en présence de pronase. La trophoblastine apparaît donc de nature protéique. Il n'est toutefois pas possible de préciser, à l'heure actuelle, s'il s'agit d'une protéine de transport de molécules actives ou si cette protéine est intrinsèquement antilutéolytique. Puisque la trophoblastine est soluble à pH 9,6, mais pas à pH 7 et 8, le point isoélectrique de cette protéine pourrait être proche de la neutralité. L'activité antilutéolytique de la trophoblastine a été retrouvée après filtration sur tamis moléculaire au niveau des composants de poids moléculaires élevés. Il est toutefois trop tôt pour savoir si la molécule support de cette activité est adsorbée par d'autres protéines ou présente réellement un poids moléculaire élevé. Si la trophoblastine fait partie des protéines visibles en électrophorèse sur gels de polyacrylamide, nous avons vu par analyse comparative, qu'elle pourrait correspondre à une protéine de faible mobilité relative (0,18) et être constituée d'un ou de plusieurs monomères d'environ 45.000 daltons.

4. Mécanisme d'action de la trophoblastine

Nous avons appelé trophoblastine le facteur protéique capable d'inhiber la lutéolyse cyclique de la Brebis. Son mécanisme d'action est totalement inconnu. Il dépend évidemment de la nature de la trophoblastine.

a) La trophoblastine est-elle une protéine intrinsèquement active ou bien une protéine porteuse de facteurs actifs qui pourraient notamment être des prostaglandines ?

- Si la trophoblastine était une protéine porteuse de prostaglandines de type E, par exemple, qui sont lutéotrophiques, comme nous le verrons plus loin, sa dégradation par la cha-



● pregnancy C.L.

• embryo

≡ ligature of uterine horn

- regression of C.L.

+ maintenance of C.L.

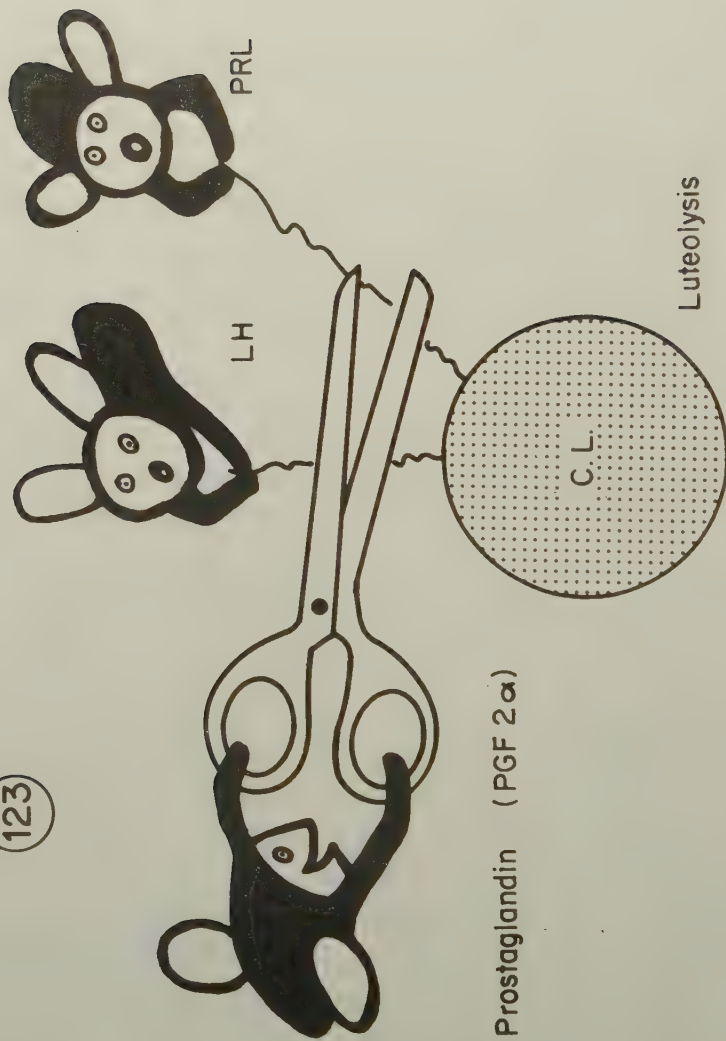
--- ablation of uterine horn

according
to MOOR and ROWSON
(1966)

-leur (80°C pendant 30mn) pourrait détruire l'action de la prostaglandine, mais il est peu probable que la pronase, qui détruit l'activité antilutéolytique du trophoblaste puisse détruire la PGE2. Sinon, il faudrait alors supposer que cette protéase contienne des déshydrogénases ou des peroxydases contaminantes, qu'il appartienne toutefois de rechercher. D'autre part, si la trophoblastine était une protéine porteuse, il faudrait admettre que la PGE2 α (par exemple), reste adsorbée fortement sur elle au cours de la filtration sur gel. Puisqu'il existe des PGE2 après le 23ème jour de gestation, il serait difficile d'expliquer la disparition d'une telle protéine non spécifique à partir de cette date. Par contre, si la protéine porteuse était spécifique, elle aurait tendance à bloquer l'activité anti-lutéolytique.

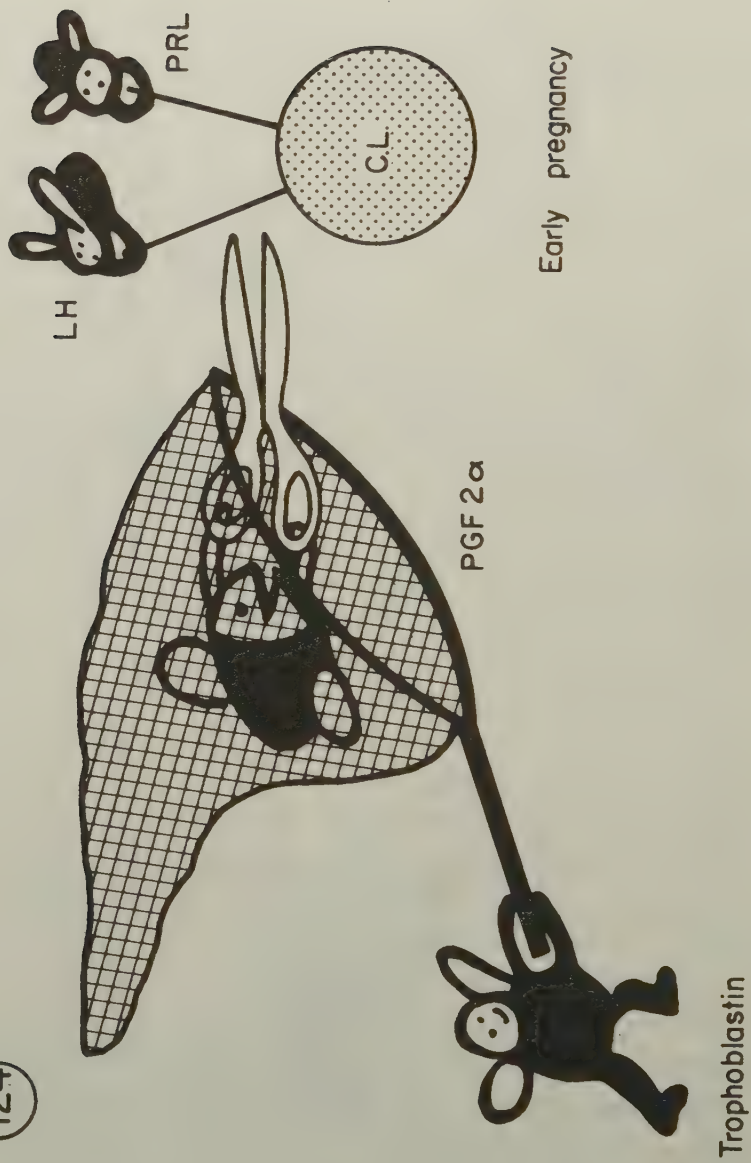
- Si la trophoblastine n'est pas une protéine porteuse, son activité antilutéolytique est intrinsèque
 Dans ce cas, il serait déraisonnable de penser que la trophoblastine puisse emprunter directement la voie de transport par contre-courant de la veine utéroovarienne à l'artère ovarienne, proposée pour la PGF2 α (Mc CRACKEN et coll., 1972 b ; HANSEL et coll., 1973). La trophoblastine ne pourrait pas, non plus, utiliser la circulation générale pour agir sur le corps jaune puisque le transfert d'un trophoblaste de 14 jours dans la corne utérine opposée au corps jaune et isolée par ligature, n'empêche pas la lutéolyse cyclique (Fig. 122) (MOOR et ROWSON, 1966). L'action de la trophoblastine est donc essentiellement locale. L'activité régulatrice de la trophoblastine ne pourrait donc se manifester sur le corps jaune que de façon indirecte par le contrôle des facteurs lutéolytiques ou lutéotrophiques qui sont essentiellement la PGF2 α (Fig. 123) (GODING, 1973) et la PGE2 (MARSH, 1970).

123



- b) L'effet antilutéolytique de la trophoblastine (Fig. 124) pourrait intervenir au niveau de la sécrétion de la PGF2 α

En début de gestation, les pics plasmatiques de sécrétion de PGF2 α dans la veine utéroovarienne sont moins nombreux et moins élevés que pendant le cycle, chez la Brebis (THORNBURN et coll., 1973 ; BARCIKOWSKI et coll. 1974 ; NETT et coll., 1976). A la suite de BAZER et THATCHER (1977), qui proposèrent d'expliquer l'action lutéotrophique des oestrogènes chez la Truie, par une inversion de polarité, on peut se demander si le mécanisme d'action le plus important de la trophoblastine ne pourrait pas également consister en une inversion partielle du sens de sécrétion de la PGF2 α : au lieu d'être sécrétée dans le sang ovarien, la PGF2 α serait excrétée, en grande partie, dans la lumière utérine. A l'appui de cette hypothèse, nous n'avons, pour le moment, que des résultats indirects. D'après des expériences de pseudogestation chez des brebis traitées par la progestérone (AMOROSO et coll., 1973) ou chez des brebis porteuses d'ovaires greffés sous la peau de l'encolure (HARRISSON et coll., 1972), les auteurs observent que la progestérone semble jouer un rôle prédominant dans l'accumulation de liquide dans la lumière utérine. Or ce liquide est riche en PGF2 α . Nous avons également signalé ci-dessus un certain nombre de cas de pseudogestation avec accumulation très importante de liquide utérin (MARTAL et coll., 1979). La présence de ces exsudats signe un changement de sens de la diffusion de l'eau, des protéines et des substances diverses en relation avec le maintien de la sécrétion de progestérone. Nous proposons donc que dans nos expériences personnelles, et au cours d'une gestation normale, la trophoblastine provoque la diffusion de la PGF2 α dans la lumière utérine, permettant ainsi le maintien du corps jaune et de la sécrétion de progestérone qui aurait pour effet secondaire l'accumulation de liquide utérin riche en PGF2 α .



- c) L'effet antilutéolytique de la trophoblastine (Fig. 124) pourrait intervenir au niveau de la synthèse, ou du métabolisme de la PGF 2α ou au niveau des mécanismes de contrôle de ces différentes étapes.
- La concentration endométriale en PGF 2α des brebis en début de gestation est supérieure à celle des brebis en cycle (WILSON et coll., 1972 ; LEWIS et coll., 1977), ce qui n'est toutefois pas incompatible avec une inhibition de la biosynthèse de prostaglandine F 2α .
 - L'accumulation des métabolites de la PGF 2α n'est apparemment pas augmentée dans l'endomètre des brebis gestantes (LEWIS et coll., 1977), ce qui n'est pas en faveur d'un effet antilutéolytique important de la trophoblastine au niveau du catabolisme de la PGF 2α .
 - On sait que chez la Brebis, la lutéolyse est sous contrôle oestrogénique et ocytocique. Les oestrogènes sont en effet lutéolytiques à la fin du cycle oestral chez la Brebis (DENAMUR et KANN, 1973 ; BOLT et HAWK, 1975). Par contre, l'administration d'oestradiol 17 β qui entraîne régulièrement la lutéolyse chez des brebis en cycles ne l'induit que chez 70 % des brebis gestantes (KITOK et BRITT, 1977). L'administration d'ocytocine dans l'artère utérine provoque d'amples décharges plasmatiques de PGF 2α chez la Brebis au 16ème jour du cycle, mais pas chez la Brebis au 16ème jour de gestation. Chez la Brebis gestante, le nombre de récepteurs à l'ocytocine dans l'endomètre (environ 33 fmole/mg de protéine) est nettement inférieur à celui de la Brebis en cycle (< 250 fmole/mg de protéine) (Mc CRACKEN, 1980). Lorsque l'on traite des utérus transplantés au 2ème, 6ème et 10ème jours du cycle, par la progestérone pendant 10 jours continus, il faut un prétraitement d'oestradiol 17 β pendant 6 heures avant l'administration d'ocytocine pour que celle-ci provoque la décharge de PGF 2α (Mc CRACKEN et coll., 1978 ; Mc CRACKEN, 1980).

L'ensemble de ces expériences suggère le mécanisme du contrôle de la lutéolyse suivant: selon Mc CRACKEN, 1980 , (Fig. 125):

L'action lutéolytique des oestrogènes exige une certaine mise en réserve de phospholipides dans les cellules endométriales qui serait provoquée par la progestérone. BRINSFIELD et HAWK (1973) ont montré que cette hormone induit l'accumulation de gouttelettes lipidiques. La transformation de phospholipides en acide arachidonique, précurseur des prostaglandines, est due à l'action de la phospholipase A2 (KUNZE et VOGT, 1971 ; RAMWELL et coll., 1977). L'activation de cette enzyme pourrait être AMP cyclique dépendante, par analogie à la production de prostaglandines par la TSH dans les cellules thyroïdiennes (HAYE et coll., 1973, 1976). Les oestrogènes stimulent directement l'activité du système prostaglandine synthétase, d'après BARCIKOWSKI et coll., (1974) et CASTRACANE et JORDAN (1976). Après la mise en réserve des phospholipides sous l'action de la progestérone, l'effet lutéolytique rapide de l'ocytocine pourrait s'expliquer par l'activation d'une cyclase au niveau de la phospholipase A2. Un mécanisme comparable a été évoqué par LIGGINS (1979) pour l'initiation de la parturition. Les pics de décharges de $\text{PGF}_2\alpha$ pourraient donc provenir des stimulations ocytociques. Le traitement d'oestradiol 17β pendant 6 heures précédant l'action de l'ocytocine pourrait correspondre à l'induction de récepteurs à l'ocytocine par l'oestradiol 17β . En début de gestation, les niveaux d'oestrogènes sont nettement plus bas qu'à la fin du cycle oestral, ce qui peut expliquer la moindre sensibilité de l'endomètre à l'ocytocine. De plus, le rôle abortif des oestrogènes dans certaines espèces pourrait alors s'expliquer par leur capacité d'induction des récepteurs à l'ocytocine. Enfin, la progestérone qui inhibe l'accumulation de récepteurs cytoplasmiques à l'oestradiol 17β (KOLIGIAN et STORMSHAK, 1977) limiterait, par suite, l'induction par les oestrogènes de récepteurs à l'ocytocine. Ces récepteurs à l'ocytocine seraient capables de stimuler également le système prostaglandine synthétase. L'intervention éventuelle de la trophoblastine dans ce modèle de

la lutéolysèreste, à l'heure actuelle, tout à fait spéculatif.

- La formation d'endoperoxyde à partir d'acide arachidonique fait appel à l'activité d'une cyclooxygénase. Un mécanisme d'inhibition de cet enzyme pourrait être assez répandu. Il fait appel à la destruction de son activateur principal par un inhibiteur. On pourrait donc concevoir que la trophoblastine présente un rôle identique à cet inhibiteur. DINEEN et coll., (1974) et COOK et LANDS (1976) ont décrit dans le surnageant 105.000g, des glandes séminales de Ruminant, un inhibiteur de la cyclooxygénase comparable à la trophoblastine. Cet inhibiteur est thermolabile, non dialysable et davantage actif à pH alcalin (supérieur à 8,6). Son poids moléculaire est d'environ 100.000 daltons.

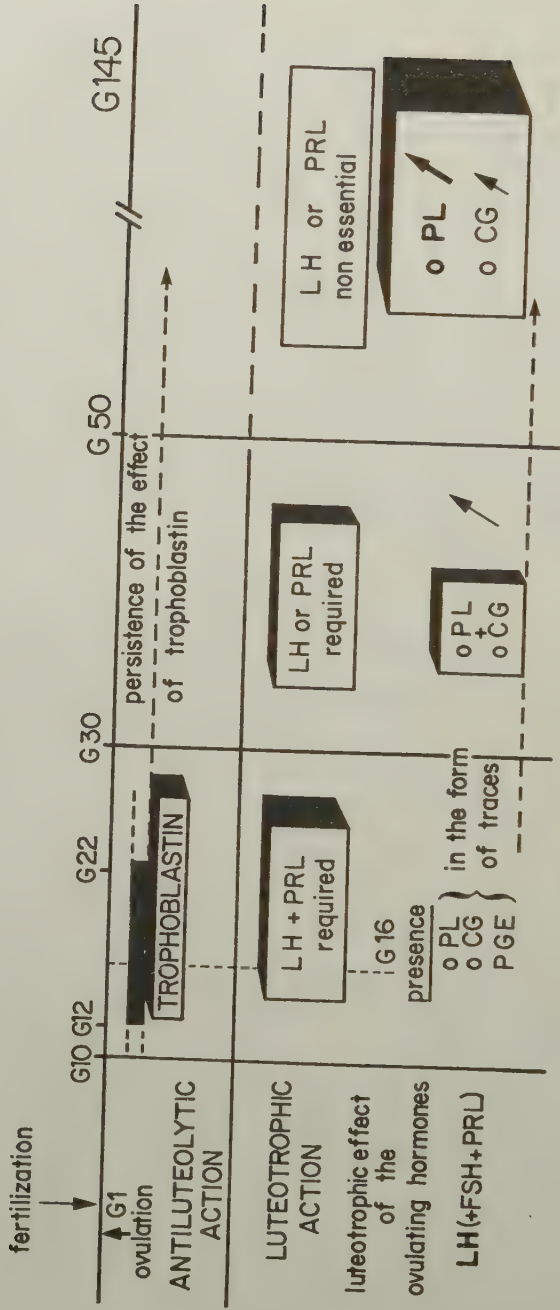
d) L'effet antilutéolytique de la trophoblastine pourrait donc encore se manifester par stimulation de facteurs lutéotrophiques, tels que la PGE2.

Alors que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ est vasoconstrictrice au niveau des capillaires du corps jaune (NISWENDER et coll., 1976), la PGE2 présente un effet vasodilatateur (STRONG et BOHR, 1967 ; RANKIN et PHENETTON, 1976). On sait que la vasoconstriction des artères utérines, provoquée par la nor-adrénaline, chez des brebis gestantes est plus faible que celle provoquée chez des brebis vides, mais aussi, que la PGE2 ne reproduit pas tous les effets vasculaires du conceptus, (POPE et STORMSHAK, 1979). Il s'ensuit que d'autres facteurs que la PGE2 peuvent être impliqués dans le contrôle de la fonction lutéale, et notamment de la vascularisation. On ne connaît pas le rôle éventuel des thromboxanes. Par contre, la prostacycline PGI_2 est un important modulateur des niveaux d'AMP cyclique dans l'endomètre de Ratte (VE-SIN et coll., 1979). Or, on sait que la PGE2 présente (Fig.121), comme la LH, une action stéroïdogène car elle est capable de stimuler l'adénylatecyclase et la synthèse lutéale de progestérone in vitro (MARSH, 1970). Les cellules du corps jaune possèdent d'ailleurs des récepteurs propres à la

PGE2 (RAO, 1975), bien différenciés de ceux de la PGF2 α (POWELL et coll., 1974). Chez la Brebis, la PGE2 est abondamment sécrétée dans la veine utéroovarienne à des taux de quelques ng par ml, comparables à ceux de PGF2 (LEWIS et coll., 1978). L'endomètre et les trophoblastes de 14 à 23 jours en contiennent également en assez fortes concentrations (LACROIX et KANN, 1980). A 14 jours de gestation, la concentration endométriale de PGE2 est nettement plus élevée que chez la Brebis en cycle au même stade, soit respectivement 754 ± 85 pg/mg ($n = 13$) et 319 ± 27 pg/mg ($n = 6$) (LACROIX, communication personnelle). A 23 jours de gestation, le taux endométrial de PGE2 est sensiblement celui de 14 jours du cycle. La PGE2 du trophoblaste pourrait être synthétisée in situ.

Les trophoblastes de 14 et 23 jours contiennent, au total, respectivement 147 ± 26 ng ($n = 12$) et 94 ± 26 ng ($n = 5$) de PGE2. Puisque les prostaglandines peuvent diffuser dans la lumière utérine, elles peuvent probablement également diffuser dans le trophoblaste. Le rapport des concentrations de PGE2 et de PGF2 α , le 14ème jour de gestation est environ le double de celui du même jour du cycle. Ce rapport PGE2/PGF2 α reviendrait à l'unité le 23ème jour de gestation, moment où la régression lutéale est définitivement inhibée (LACROIX et KANN, 1980). Ces résultats suggèrent fortement un rôle de la PGE2 dans l'inhibition de la lutéolyse en début de gestation chez la Brebis. De plus, la perfusion simultanée de PGE2 et de PGF2 α à des taux physiologiques de 10 μ g inhibe l'action lutéolytique de cette dernière (HENDERSON et coll., 1977 ; LEWIS et coll., 1978). Les concentrations sanguines de PGE2 dans la veine utéroovarienne au niveau de l'ovaire ne sont toutefois pas significativement différentes entre les brebis en gestation et celles en cycle (LEWIS et coll., 1978). INSKEEP et coll., (1975) ont suggéré que le conceptus pourrait exercer une action directe sur l'ovaire, car des injections de PGF2 α dans cet organe

MAINTENANCE OF PREGNANCY CORPUS LUTEUM



sont lutéolytiques chez des brebis en cycle, mais pas chez des brebis gestantes. L'existence d'un constituant antilutéolytique diffusible par contre-courant et bloquant l'activité de la $\text{PGF2}\alpha$ sur l'ovaire reste donc une possibilité. La sécrétion de PGE2 pourrait donc expliquer un effet direct du conceptus sur la synthèse de la progestérone par des tranches de corps jaune de Brebis, in vitro (GODKIN et coll., 1978). Mais, à la différence de la trophoblastine, la PGE2 n'est pas capable de prolonger la vie du corps jaune pendant de longues périodes : des injections intra-utérines de PGE2 (à la dose de $900 \mu\text{g} \times 3$ par jour, du 12ème jour jusqu'à l'oestrus) ne retardent la lutéolyse cyclique que pendant environ 2 jours (PRATT et coll., 1977). Il est possible, par contre, que la trophoblastine favorise la synthèse de la PGE2 au niveau de la cellule endométriale. L'existence d'enzymes tels que la PGE2 9-céto-réductase et la $\text{PGF2}\alpha$ 9-hydroxydéshydrogénase, qui peuvent convertir la prostaglandine E2 en $\text{F2}\alpha$ et réciproquement, a été rapportée dans divers tissus animaux tels que le rein, (DUNN et HOOD, 1977), le testicule (THUY et CARPENTER, 1978), le foie (HENSBY, 1975) et le tissu ovarien (WATSON et coll., 1979). On peut encore proposer pour la trophoblastine un rôle dans la régulation de l'interconversion des prostaglandines E2 et $\text{F2}\alpha$ au niveau de l'endomètre, ce qui expliquerait l'augmentation momentanée du rapport $\text{PGE2}/\text{PGF2}\alpha$.

En conclusion, le schéma de la Fig. 126 résume les rôles respectifs joués par les divers facteurs lutéotrophiques et antilutéolytiques dans le maintien du corps jaune gestatif au cours de l'établissement de la gestation puis de son évolution.

RÉSUMÉ ET

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Une étude comparative des diverses hormones lactogènes placentaires est présentée dans l'introduction. Selon les Mammifères considérés, certaines espèces possèdent à la fois une activité lactogène et une activité de croissance, d'autres ne possèdent pas l'activité de croissance ou très faiblement. D'autres encore ne possèdent pas d'hormone lactogène placentaire (Fig.1, Tableaux I et II).

L'hormone lactogène placentaire ovine (oPL) ou somatomammotrophine chorionique ovine (oCS) a été purifiée et présente des activités spécifiques lactogène et de croissance respectivement comparables à celles de la prolactine (PRL) et de l'hormone somatotrope hypophysaire (GH). Nous avons réalisé la première purification de cette hormone en 1975 en même temps que deux autres groupes, celui de FELLOWS (1974,1977) et celui de FRIESEN (1976) (Tableau I). Seule l'hormone lactogène placentaire humaine (hPL ou hCS) était alors bien connue mais diverses activités lactogènes placentaires avaient été mises en évidence chez plusieurs espèces (Tableau II). A la différence de l'hormone humaine, l'oCS présente l'importante particularité de posséder une forte activité de croissance (Tableau I), ce qui justifie notre préférence pour la nomenclature internationale : oCS. Même à l'heure actuelle, l'oCS est la seule hormone lactogène placentaire animale qui soit réellement bien connue autant du point de vue physico-chimique que du point de vue biologique.

L'analyse approfondie des propriétés de l'oCS apporte de nouvelles données très intéressantes pour mieux comprendre les mécanismes du contrôle de la gestation, notamment chez les Ruminants.

En raison du rôle pléiotypique de cette nouvelle

hormone, il nous est apparu vain et d'un intérêt douteux, de nous limiter arbitrairement à un aspect particulier. Alors que nous ignorions tout sur cette hormone en 1973, nous avons recherché et analysé les multiples propriétés de l'oCS et ses implications dans de nombreux mécanismes physiologiques tels que la croissance foetale, la mammogénèse ou le maintien du corps jaune gestatif. En raison de l'importance probable d'une telle hormone dans des domaines encore très peu explorés, nous avons essayé de rechercher, à la lumière de nos connaissances d'endocrinologie comparée, certaines propriétés structurales ou métaboliques fondamentales qui pourront constituer de bonnes hypothèses de travail. Cette méthode "intégrative" de recherches nous a conduit à envisager l'existence d'une nouvelle protéine, la trophoblastine dont les multiples modes d'action possibles ont fait l'objet d'une discussion stimulante lors d'une récente Gordon Conférence (1980) sur le tractus génital des Mammifères.

La méthode de purification de l'oCS (Chapitre I) fait appel à un certain nombre de techniques classiques (Fig.6).

La caractérisation de l'activité hormonale est basée sur diverses méthodes comme le dosage radiorécepteur des activités lactogène et somatotrope, des tests d'activités lactogènes in vitro et des tests d'activité de croissance in vivo. L'analyse d'éventuels contaminants prolactinique ou somatotrope hypophysaires a été effectuée par dosages radio-immunologiques de ces hormones car il n'existe pas de réaction immunologique croisée entre l'oCS et la prolactine ou l'hormone de croissance ovines. L'homogénéité des préparations d'oCS a été régulièrement testée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Le caractère bicéphale de la molécule d'oCS (Chapitre II) a été démontré par une méthode originale de chromatographie d'affinité à base de récepteurs membranaires. Après avoir lié de l'oCS radioactive (oCS^{*}) à des membranes de glande mammaire de Lapine qui ne présentent pas de récepteurs à l'hormone de croissance, l'oCS^{*} est ensuite éluée avec du chlorure de magnésium, puis mise en présence de membranes cellulaires de foie,

particulièrement riches en récepteurs à l'hormone de croissance. L'oCS* élue des récepteurs prolactiniques se lie de manière spécifique aux récepteurs somatotropiques, ce qui démontre le caractère bifonctionnel de cette molécule (Fig.20). D'autres molécules sont également testées dans ce système, l'hGH qui est bifonctionnelle, la prolactine ovine et l'hormone de croissance bovine qui sont monofonctionnelles (fig.19). Ce résultat est la première preuve directe du caractère bifonctionnel d'une hormone lactogène placentaire animale. La résolution d'un tel problème était fondamentale car on a confondu pendant plus de quinze ans la prolactine et l'hormone de croissance humaines qui présentent des caractéristiques physicochimiques identiques. Cette démonstration était d'autant plus importante que l'hCS ne possède qu'une très faible activité de croissance équivalente à celle d'une contamination par des hormones hypophysaires (Tableaux I, IV, V).

Les propriétés physicochimiques principales de l'oCS (chapitre III) ont été étudiées par électrophorèse sur gels de polyacrylamide dénaturants ou non, par filtration sur gels et par focalisation isoélectrique. Le poids moléculaire de l'oCS est égal à environ 20.000-22.000 daltons et apparaît identique à celui de l'hCS et des hormones de croissance. Le rayon de Stokes apparent de l'oCS est de $21\text{\AA}$. La mobilité électrophorétique de l'oCS, à pH alcalin, est analogue à celle de l'OGH ($R_f \approx 0,20$). La molécule d'oCS est donc moins acide que celle de prolactine ovine ou d'hCS (Fig.28). Le point isoélectrique de l'oCS est de 7,2 (Fig.29).

Les propriétés immunologiques de l'oCS (Chapitre IV) ont été analysées, principalement par comparaison avec la prolactine, l'hormone de croissance et l'hCS. Elles ont été examinées par des méthodes variées : immunodiffusion en gel d'agarose, dosage radioimmunologique et immunofluorescence. L'oCS ne présente de réaction immunologique croisée avec aucune hormone examinée (hCS, oPRL, oGH, bGH, hGH) (Tableau XI) alors qu'il existe une importante réaction immunologique croisée entre

l'hCS et l'hGH. De même, aucune réaction croisée n'a pu être mise en évidence, par immunofluorescence, entre l'oCS et la bCS, à partir de coupes de placentas bovins et d'immunosérums anti-oCS. Ces résultats ont notamment pour conséquence la possibilité de déterminer les activités lactogène et somatotrope de l'oCS par différence entre l'activité totale, mesurée par dosage radiorécepteur, et l'activité spécifique de l'oPRL ou de l'OGH estimée par dosages radioimmunologiques.

Bien que nous ne possédions encore que très peu de données sur la structure des hormones lactogènes placentaires, nous nous sommes livrés à une analyse prospective (Chapitre V) à partir des résultats de la littérature sur la superfamille des prolactines, des hormones de croissance et des hormones placentaires. Il est possible d'établir tellement d'homologies entre ces molécules qu'il nous est apparu utile de chercher à mieux connaître la famille des hormones lactogènes placentaires du point de vue structural.

Bien que l'activité de croissance de l'hCS soit beaucoup plus faible que son activité lactogène, sa structure est nettement plus proche du groupe des hormones de croissance que de celui des prolactines. L'activité de croissance élevée des hormones lactogènes placentaires de Ruminants ne devrait que confirmer cette tendance apparemment étonnante. Les hormones lactogènes placentaires paraissent donc de structure hybride mais plus proches des hormones de croissance (Fig.42, Tableau XII). En nous basant sur les compositions en aminoacides de l'oCS, de la bCS et de l'hCS ainsi que sur celles de molécules de prolactine et de GH primitives ou récentes (Tableau VII, Fig.42), nous avons proposé un modèle d'archétype moléculaire de la superfamille des hormones de croissance, des prolactines et des hormones lactogènes placentaires (Fig.44) ainsi qu'un arbre phylogénique (Fig.45). Le moment de la divergence entre les molécules de prolactines et d'hormones de croissance peut être estimé à environ 350 millions d'années. Le moment de l'apparition des molécules d'hormones lactogènes placentaires à partir d'une duplication du cistron

des hormones de croissance, pourrait se situer à environ 75 millions d'années, en même temps que le rayonnement des Mammifères placentaires. De plus, la comparaison des homologies structurales externes des molécules d'hCS, de PRL et de GH (Fig.42) fait apparaître une délétion d'un peptide de 9 aminoacides en position 5 à 14 dans les molécules d'hCS et de GH qui contiennent environ 191 aminoacides. Par contre, toutes les prolactines, qui possèdent environ 199 aminoacides, présentent ce peptide et un 3e pont disulfure (Fig.41 et 42) correspondant aux cystéines en positions 4 et 11. Si l'on examine le tableau VII dans lequel la composition en aminoacides de l'oCS a été établie par le groupe de FELLOWS, il s'ensuit une contradiction avec les résultats précédents : en effet, l'oCS qui posséderait 193 aminoacides, donc très probablement la délétion du peptide 5-14, ne peut présenter 6 cystéines, c'est-à-dire 3 ponts disulfure puisque le 3e pont S-S est précisément dans cette zone de délétion. Il s'ensuit donc que cet important aspect de la structure de l'oCS doit être examiné.

L'étude des relations structure-fonction des molécules à activité lactogène et à activité de croissance fait ressortir l'importance d'un petit peptide, en position 135-140, inhibiteur des activités lactogènes et de croissance et propre aux trois familles d'hormones. Il en résulte que la molécule d'oCS devrait également le contenir.

L'étude des analogies structurales fait apparaître que les sites responsables des activités de croissance et des activités lactogènes des molécules de PRL, de GH et d'hCS se trouvent dans la première moitié de la molécule, en région 1-134. Il en serait de même des principales activités métaboliques. Ces résultats sont probablement généralisables à la molécule d'oCS (Fig.46). Les études de recombinaisons hétérologues (LI, 1978) entre le fragment 1-133 d'hCS et le fragment 141-191 d'hGH montrent que cette molécule hybride ne présente pas d'activité de croissance alors que le recombinat du peptide 1-134 d'hGH et du peptide 141-191 d'hCS est très actif dans le test du tibia mais ne correspond toutefois qu'à 50% de l'activité d'un hybride non covalent d'hGH (1-134 et 141-191) qui est aussi actif que

la molécule native. Cette baisse d'activité due au fragment d'hCS 141-191 ne s'explique que par la différence entre deux aminoacides dont l'un est hydrophobe dans les deux molécules. Par contre, l'autre aminoacide, l'Histidine 153 de l'hCS correspond au résidu Acide aspartique dans les molécules d'hGH et de toutes les autres hormones de croissance connues. Il en résulte que les différences importantes d'activité de croissance entre les molécules d'hormones lactogènes placentaires pourraient également provenir de la présence d'aminoacides inhibiteurs. Une faible activité de croissance pourrait alors résulter d'avantage d'une mauvaise liaison du site biologique à son récepteur que d'une absence de site fonctionnel proprement dite.

Le site de synthèse de l'oCS a été localisé par immunofluorescence au niveau des grandes cellules binucléées PAS positives de l'épithélium chorionique (fig.48 et 49) (chapitre VI).

Bien que ces cellules soient connues depuis très longtemps, on ne connaissait aucune de leur sécrétion. Ces cellules binucléées ont la propriété de migrer vers l'épithélium maternel et cette migration hormonodépendante pourrait expliquer le mode de sécrétion de l'oCS dans le sang maternel. Nous avons proposé une hypothèse de travail pour l'étude de la migration de ces cellules faisant appel à l'activateur de plasminogène. Enfin, l'utilisation de divers immunsérums anti-hCG, anti-TSH, anti-ACTH, anti-somatostatine, anti-LH, anti-sous-unités LH α et LH β ne nous ont pas permis, par la technique d'immunofluorescence, de montrer, comme dans l'espèce humaine, que le placenta des Ruminants était capable de sécréter beaucoup d'hormones identiques aux hormones hypophysaires ou hypothalamiques .

La production et la régulation de la sécrétion d'oCS ont été étudiées au chapitre VII. L'évolution des taux sériques d'oCS maternelle a été analysée par dosage radiorécepteur du 60e jour de gestation à la mise-bas. Les activités lactogène et somatotrope sériques sont synchrones (Fig.50), ce qui est

en bon accord avec le caractère bifonctionnel de l'hormone. Ces profils plasmatiques de sécrétion d'oCS ont permis de mettre au point, par dosage radiorécepteur de l'activité somatotrope sérique, un diagnostic de gestation dont l'exactitude à 110 jours est de 98-99% (Tableau XV) et un diagnostic de gémellité dont l'exactitude est de 90% (Tableau XVIII, Fig.62). L'activité somatotrope de l'oCS maternelle durant le dernier tiers de la gestation est 100 à 300 fois plus élevée que celle de l'OGH plasmatique (Fig.50 et 36), ce qui suggère un rôle métabolique important de l'oCS. L'évolution de l'oCS a été également mesurée dans le sang foetal, dans les liquides amniotiques et allantoïdiens.

Le taux de sécrétion de l'oCS est d'environ 10-15mg par jour pendant le dernier tiers de la gestation et la demi-vie moyenne de l'activité somatotrope est d'environ 35mn alors que celle de l'activité lactogène est d'environ 55mn. Le rapport de ces demi-vies correspond sensiblement à celui des activités dans le sang maternel. L'activité somatotrope de l'oCS est donc plus labile que l'activité lactogène. Il en est de même chez le foetus chez lequel le rapport de ces activités est de 1 à 2 alors qu'il est de l'ordre de 1 à 4 dans le liquide allantoïdien. De plus, tout au long des étapes de purification ou lors de la radioiodation, on peut aussi observer que l'activité de croissance de l'oCS est moins stable que son activité lactogène.

L'oCS est détectable dès le 16e jour de gestation dans les homogénats de trophoblastes. La production d'oCS n'apparaît pas synchrone de la croissance placentaire (Fig.59). En effet, le poids des cotylédons foetaux augmente rapidement jusqu'au 70e jour de gestation puis reste presque constant jusque vers le 140e jour alors que la concentration d'oCS placentaire augmente jusque vers le 110e jour, reste ensuite constante jusqu'au 130e jour, pour décroître considérablement dès le 140e jour. On enregistre, à partir de cette date, une très importante histolyse du placenta.

Après traitement des brebis par la bromocryptine

(2mg/jour) dès le 70e jour de gestation, la concentration placentaire d'oCS est nettement augmentée alors que les taux sanguins restent inchangés. L'oCS placentaire est environ 4 à 6 fois plus élevée entre 80 et 100 jours de gestation que chez la brebis normale (Fig.63). La période de synthèse maximale d'oCS est donc avancée d'environ un mois. Ces résultats sont importants parce qu'ils suggèrent deux types possibles de régulation de la sécrétion d'oCS :

- La suppression de la prolactine par la bromocryptine pourrait correspondre à l'arrêt d'un feed-back négatif et entraîner une synthèse accrue d'oCS. Un tel contrôle impliquerait que la prolactine puisse atteindre les cellules binucléées et que des récepteurs à la prolactine soient présents sur ces cellules.
- Une seconde hypothèse, complémentaire, peut être envisagée puisque la sécrétion d'oCS est proportionnelle à l'oCS synthétisée chez la brebis normale et que les concentrations d'oCS sériques ne sont pas augmentées chez la brebis traitée, cela suggère l'existence d'une inhibition relative de la libération d'oCS. Cette inhibition pourrait être provoquée par la bromocryptine. Par analogie avec l'action in vitro de cette drogue sur les cellules hypophysaires qui possèdent des récepteurs à la dopamine, la présence de récepteurs de type dopaminergique sur les cellules binucléées à oCS peut être postulée. L'existence de tels récepteurs au niveau du placenta n'a toutefois jamais été encore signalée, à notre connaissance.

La participation de l'oCS au contrôle de la croissance foetale a été étudiée au chapitre VIII. Après hypophysectomie du foetus, la croissance de celui-ci semble pouvoir se poursuivre normalement ou presque chez diverses espèces : l'hormone de croissance hypophysaire ne paraît donc pas indispensable.

Nous avons vu que l'oCS est capable de stimuler la croissance pondérale et la croissance osseuse de rats hypophysectomisés. L'oCS se fixe aux récepteurs hépatiques à l'hormone de croissance. On sait, d'autre part, que l'oCS est capable de stimuler la sécrétion de somatomédines. Nous obtenons d'ailleurs

une bonne proportionnalité entre la quantité de somatomédine A par fœtus et la quantité totale d'activité de croissance (oCS + oGH) durant le dernier tiers de la gestation (Fig.82). Pendant le premier mois de gestation, la production d'oCS et la croissance pondérale de l'embryon augmentent de manière exponentielle bien qu'il n'existe pas encore d'hormone de croissance hypophysaire (Fig.68). Ensuite, la concentration de cette dernière augmente dans le sang fœtal mais, au 4e mois de gestation, elle n'est encore que la moitié de celle de l'oCS fœtale, exprimée en standard oGH NIH (Fig.52). Ce n'est qu'au moment du terme (5e mois) que les niveaux sériques de ces deux hormones sont sensiblement équivalents. Entre le 60e et le 140e jour de gestation, la somme des activités de croissance sanguines (oCS + oGH) fœtales, reste constante aux alentours de 200 ng/ml. Il en résulte une étroite proportionnalité entre la quantité totale sérique de ces hormones et la croissance pondérale du fœtus de Mouton (Fig.76). L'analyse des courbes de croissance de fœtus d'agneaux, et notamment l'ajustement logistique (Fig.79) suggèrent encore un rôle de l'oCS dans le contrôle de la croissance fœtale.

En nous basant, d'une part sur la connaissance du métabolisme des Ruminants et, d'autre part, sur les propriétés métaboliques de l'oGH, de la PRL et de l'hCS, ainsi que sur quelques résultats préliminaires sur le rôle de l'oCS, nous avons fait une étude prospective sur les activités métaboliques probables de l'oCS (Chapitre IX). L'oCS semble être capable de provoquer la sécrétion d'insuline, ce qui est favorable à la croissance pondérale du fœtus, d'autant plus que, malgré les taux élevés d'acides gras libres maternels, c'est le glucose qui est le principal métabolite du fœtus de Ruminants. Il semble encore probable que l'oCS présente la même activité lipolytique que l'hCS, l'oGH, le bGH ou l'hGH. La forte activité somatotrope de l'oCS sérique maternelle pourrait alors expliquer l'augmentation progressive des acides gras libres sanguins à partir du 100e jour de gestation. Il en résulte que l'oCS peut être impliquée dans la pathogénie de la toxémie de gestation

de la brebis (Fig.89) car les taux sériques d'oCS sont particulièrement élevés lors de gémellité et que la toxémie de gestation, qui est caractérisée notamment par une importante acétonémie, survient chez des brebis à gestation multiple dont les pertes glucidiques ont été considérables lors de l'édification des foetus. De même, un autre modèle a été proposé faisant intervenir la bCS dans la pathogénie de l'Acétonémie puerpérale de la vache laitière (Fig.90). Enfin l'action probable de l'oCS sur l'anabolisme protéique maternel et foetal pourrait être, d'une part, directe comme c'est le cas pour l'hormone de croissance et l'hCS, et d'autre part, indirecte en augmentant l'insulinémie. En conséquence, il est probable que l'oCS est comme l'hCS, une importante hormone métabolique de gestation dont les activités possibles sont résumées sur la Fig. 91.

La participation de l'oCS au contrôle de la mammo-génèse et de la lactogénèse a été étudiée de manière approfondie au chapitre X. En présence de cortisol, l'oCS présente une action mammogène et lactogène in vitro, sur des explants de glande mammaire de Brebis au 30e jour de gestation (Fig. 101B). In vivo, l'oCS permet un développement normal de la glande mammaire chez des brebis privées de prolactine après traitement par la bromocryptine (Fig.92). En effet, la quantité d'ADN et d'ARN mammaires ainsi que le poids du tissu déshydraté sont identiques à ceux des animaux témoins. Puisque la prolactinémie des animaux traités est presque nulle et que la sécrétion d'oCS n'est pas modifiée par la bromocryptine, l'oCS apparaît donc comme l'hormone essentielle de la mammogénèse. En revanche, la prolactine pourrait présenter une importance particulière dans le métabolisme hydrominéral de la glande mammaire puisque le poids frais du tissu mammaire paraît réduit chez les animaux traités par la bromocryptine (Fig.96). Les molécules d'oCS et de prolactine pourraient ne pas présenter le même pouvoir osmorégulateur. Il est d'ailleurs probable qu'il existe deux espèces de récepteurs lactogènes chez la Brebis : les récepteurs prolactiniques et les récepteurs à l'oCS.

Le pouvoir lactogène de l'oCS a été mis en évidence *in vitro* chez la Lapine et la Brebis. L'activité lactogène de l'oCS a été mesurée par la synthèse du lactose et des caséines immunoprécipitables (Fig.100). L'oCS augmente les activités lactose synthétase et galactosyltransférase (Fig.99). A l'examen histologique, on constate la présence d'abondants produits de sécrétion dans la lumière des acini (Fig.101 A et B). Le complexe lactogène minimum est constitué chez la Brebis par l'association oCS-cortisol ou prolactine-oGH-cortisol.

In vivo l'augmentation du taux sérique d'oCS coïncide avec l'apparition du lactose dans la glande mammaire à 95-100 jours de gestation. Ces résultats suggèrent que l'oCS, plutôt que la prolactine et la STH, serait responsable de la lactogénèse de gestation. En présence de cortisol, l'oCS est capable d'induire chez la Brebis traitée par la bromocryptine, une production laitière pendant la gestation (Fig.102). Lorsque l'on supprime par hystérectomie la source d'oCS, les brebis hypoprolactinémiques traitées par le cortisol, ne présentent pas de sécrétion lactée. Ces expériences démontrent que l'oCS est capable d'induire une montée laiteuse mais que cette potentialité est inhibée chez la brebis normale. L'injection simultanée de progestérone et de cortisol à des brebis traitées par la bromocryptine ne permet pas de reproduire l'inhibition physiologique de la montée laiteuse (Fig.103).

Les interrelations endocriniennes dans le contrôle des mécanismes de l' inhibition de la montée laiteuse ont été analysées au niveau de la régulation de l'expression des gènes des lactoprotéines chez la Brebis. Les rôles respectifs de l'oCS, de la prolactine, du cortisol et de la progestérone dans l'induction de l'activité sécrétoire ont été étudiés par la quantification de l'activité messagère des ARN polysomaux des caséines (Fig. 104). Le cortisol ne présente pas d'effet lactogène propre. L'injection de progestérone dès la veille de l'hystérectomie, au 115e jour de gestation chez la Brebis, provoque une très forte diminution (80%) de la quantité d'ARNm des caséines bien que les taux d'oCS et de prolactine soient

considérables.

Après hystérectomie et traitement par la bromocryptine, la traite ne suffit pas à induire une quantité importante d'ARNm des lactoprotéines. En absence d'oCS, la présence de prolactine apparaît indispensable à l'induction d'une lactogénèse.

En revanche, l'administration de cortisol dès le jour de l'hystérectomie des brebis traitées par la bromocryptine permet la synthèse d'environ 80% d'ARNm des caséines. Le cortisol présente donc un rôle amplificateur considérable dans l'expression du message lactogène. Mais il n'est pas directement responsable de l'augmentation des ARNm des caséines car l'expression des gènes des caséines diminue à mesure que l'on retarde le moment d'injection du cortisol (0h, 24h, 72h après l'opération).

Par contre, il suffit d'arrêter pendant 48 heures le traitement par la bromocryptine pour permettre une importante lactogénèse bien que le cortisol ait été administré cinq jours après l'hystérectomie. La prolactine ou l'oCS sont donc nécessaires à l'induction des ARNm des caséines.

En conclusion, dans les conditions physiologiques normales, l'effet lactogène de l'oCS apparaît inhibé par la progestérone. Mais cette inhibition étant partielle, elle autorise une lactogénèse de gestation manifestée par la synthèse d'ARN totaux, d'ARN messagers des protéines spécifiques du lait, des nucléotides libres totaux, des activités galactosyltransférase et lactose synthétase, même lorsque seules sont présentes des traces de prolactine.

De plus, le complexe hormonal de la mammogénèse étant identique à celui de la lactogénèse, la progestérone n'inhibe donc pas l'action mammogène de l'oCS. La progestérone semble diminuer essentiellement la quantité des ARNm des lactoprotéines et non celle des messagers correspondant aux protéines non sécrétées. Le cortisol est capable de lever cette inhibition mais on ne sait pas comment se fait cette dérégulation au niveau du génôme.

Après la parturition, au moment de la montée laiteuse normale, l'induction des ARNm des protéines du lait résulte de l'effet d'une forte sécrétion de prolactine en présence du cortisol et de l'hormone somatotrope endogènes : la disparition de l'inhibition progestéronique (expulsion du placenta et lyse du corps jaune gestatif) rend alors l'apport de cortisol exogène inutile.

Enfin, le rôle de l'oCS dans le maintien du corps jaune gestatif a été étudié au chapitre XI. L'activité lutéotrophique de l'oCS a été mise en évidence in vitro par incubation et périfusion de corps jaunes de Ratte. L'oCS provoque, comme la prolactine et l'hCS, la diminution de la dégradation de la progestérone. Elle inhibe l'activité enzymatique de la $20\alpha\text{OH}$ stéroïde déshydrogénase (Fig.109). In vivo, la suppression de la prolactine, consécutive au traitement par la bromocryptine, ne provoque qu'une baisse d'environ 15% du poids du corps jaune gestatif (Fig.110), ce qui confirme les résultats de l'hypophysectomie après le 50e jour de gestation relatifs au maintien de 75% des structures lutéales.

L'ablation des trophoblastes après le 22e jour de gestation ne permet le maintien du corps jaune gestatif que dans environ 50% des cas (Tableau XXIV). Ces résultats, ainsi que ceux d'autres expériences non rapportées ici, suggèrent l'existence de lutéotrophines placentaires ayant des activités analogues aux hormones lutéotrophiques hypophysaires chez la Brebis : prolactine et LH. L'oCS pourrait correspondre à la première d'entre elles. De plus, une activité de type LH-hCG a été mise en évidence dans le placenta de Brebis, par dosage radiorécepteur en présence de membranes de corps jaunes ovins. Nous l'avons appelée gonadotrophine chorionique ovine ou oCG par analogie à l'hCG (human Chorionic Gonadotropin). Cette hormone pourrait donc constituer la seconde composante des lutéotrophines placentaires de la Brebis.

Nous avons encore montré que l'oCS n'est pas le facteur embryonnaire de signal de la gestation. En effet, lorsque l'on injecte à des brebis en cycles, par voie intrautérine, des

BIBLIOGRAPHIE

- ABRAMS, R., CATON, D., CLAPP, G. & BARRON, D.H. (1969) Thermal and metabolic features of life in-utero. *Clin. Obstet. Gynecol.* 13, 549-564.
- ADAMS, J.H., DANIEL, P.M., PRITCHARD, M.M.L. (1963) The effect of stalk section on the volume of the pituitary gland of the sheep. *Acta Endocrinol.*, suppl. 81, 1-27.
- ALBERTS, A.W., FERGUSON, K., HENNESSY, S. & ROY VAGELOS, P. (1974) Regulation of lipid synthesis in cultured animal cells. *J. Biol. Chem.* 249, 5241-5249.
- ALEXANDER, G. (1964) Studies on the placenta of the sheep (*Ovis aries*, L.) : placental size. *J. Reprod. Fert.* 7, 289-305.
- ALEXANDER, G. (1964) Studies on the placenta of sheep (*Ovis aries* L.): effect of surgical reduction in the number of caruncles. *J. Reprod. Fert.* 7, 307-322.
- ALEXANDER, D.P., BRITTON, H.G. & NIXON, D.A. (1966) Observations on the isolated foetal sheep with particular reference to the metabolism of glucose and fructose. *J. Physiol. Lond.* 185, 382-399.
- ALEXANDER, P.D., BRITTON, H.G. & NIXON, D.A. (1970) The metabolism of fructose and glucose by the sheep foetus : studies on the isolated perfused preparation with radioactively labelled sugars. *Quart. J. Exptl. Physiol.* 55, 346-362.
- ALLEN, W.R., HAMILTON, D.W., MOOR, R.M. (1973) The origin of equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. *Anat. Rec.* 177, 485-502.
- ALLEN, W.R. & MOOR, R.M. (1972) The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. *J. Reprod. Fert.* 29, 313-316.
- AMOROSO, E.C. (1952) Placentation. In Marshall's Physiology of Reproduction. pp. 127-311. 3rd ed, Vol. 2; Ed. A.S. PARKES. London, Longmans, Green.
- AMOROSO, E.C., HARRISON, F.A., HEAP, R.B. & POYSER, N.L. (1973) The production of prostaglandin F-2 α by the uterus of the sheep. *J. Endocrinol.* 53, lix.
- ANDERSON, R.R. (1974) Endocrinological control in lactation. pp. 97-140, Vol. I. Eds. B.L. LARSON & V.R. SMITH. Acad. Press, New York.
- ANDERSON, L.L., BLAND, K.P., MELAMPY, R.M. (1969) Comparative aspects of uterine-luteal relationships. *Rec. Prog. Horm. Res.* 25, 57-104.
- ANDREWS, P. (1966) Molecular weights of proteins and pituitary growth hormone estimated by gel filtration. *Nature, Lond.* 209, 155-157.
- ANGELETTI, R.H. & BRADSHAW, R.A. (1972) Nerve growth factor from mouse submaxillary gland : amino acid sequence. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 68, 2417-2420.
- ARMSTRONG, D.T. & HANSEL, W. (1959) Alteration of the bovine estrous cycle with oxytocin. *J. Dairy Sci.* 42, 533-542.
- ARMSTRONG, D.T., KNUDSEN, K.A., MILLER, L.S. (1970) Effects of prolactin upon cholesterol metabolism and progesterone biosynthesis in corpora lutea of rats hypophysectomized during pseudopregnancy. *Endocrinology.* 86, 634-641.
- ARMSTRONG, D.T., O'BRIEN, J., GREEP, R.O. (1964) Effects of luteinizing hormone on progesterin biosynthesis in the luteinized rat ovary. *Endocrinology.* 75, 488-500.

- ASSAIRI, L., DELOUIS, C., GAYE, P., HOUDEBINE, L.M., OLLIVIER-BOUSQUET, M. & DENAMUR, R. (1974) Inhibition by progesterone of the lactogenic effect of prolactin in the pseudopregnant rabbit. *Biochem. J.* 144, 245-252.
- ASSHETON, R. (1906) The morphology of the ungulate placenta, particularly the development of that organ in the sheep, and notes upon the placenta of the elephant and hyrax. *Philosophical Transactions of the Royal Society, series B.* 198, 143-244.
- ASTWOOD, E.B. & GREEP, R.O. (1938) *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 38, 713.
- AZHAR, S., MENON, K.M.J. (1975 a) Cyclic AMP dependent and plasma membrane associated protein kinase from bovine corpus luteum solubilization and properties of solubilized enzyme. *Eur. J. Biochem.* 58, 105-115.
- AZHAR, S., MENON, K.M.J. (1975 b) Adenosine 3'5' monophosphate dependent phosphorylation of ribosomes and ribosomal subunits from bovine corpus luteum. *Biochim. Biophys. Acta.* 392, 64-74.
- AZHAR, S., MENON, K.M.J. (1975 c) Cyclic AMP and luteinizing hormone stimulated protein kinase from bovine corpus luteum evidence for activation through separate mechanisms. *FEBS Lett.* 51, 25-28.
- BAIN, A.D. & SCOTT, J.S. (1960) Renal agenesis and severe urinary tract dysplasia. A review of 50 cases with particular reference to associated anomalies. *Brit. Med. J.* 1, 841-846.
- BAIRD, D.T. (1974) Prostaglandin $F_{2\alpha}$ and ovarian blood flow in sheep. *J. Endocr.* 62, 413-414.
- BALA, R.M., BOHNET, H.G., CARTER, J.N. & FRIESEN, H.G. (1978) Effect of ovine prolactin on serum somatomedin bioactivity in hypophysectomized female rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 56, 984-987.
- BALLARD, F.J. (1972) Effects of fasting and refeeding on the concentration of glycolytic intermediates and the regulation of lipogenesis in rat adipose tissue *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta.* 273, 110-118.
- BARCIKOWSKI, B., CARLSON, J.C., WILSON, L. & McCracken, J.P. (1974) The effect of endogenous and exogenous estradiol 17β on the release of prostaglandin $F_{2\alpha}$ from the ovine uterus. *Endocrinology.* 95, 1340-1349.
- BARNES, R.J., COMLINE, R.S., SILVER, M. & STEVEN, D.H. (1976) Ultrastructural changes in the placenta of the ewe after foetal hypophysectomy or adrenalectomy. *J. of Physiology.* 263, 173-174.
- BASS., F., KRANE, E.J., MALLON, K., NATHANIELSZ, P.W., STEVEN, D.H., THOMAS, A.L. (1977) Mobilization of binucleate cells in the placenta of the ewe after foetal pituitary stalk section. *J. Endocr.* 73, 36P-37P.
- BASSETT, J.M. & MADILL, D. (1974) The influence of maternal nutrition on plasma hormone and metabolite concentration in foetal lambs. *J. Endocr.* 61, 465-477.
- BASSETT, J.M., OXBORROW, T.J., SMITH, I.D. & THORNBURN, G.D. (1969) The concentration of progesterone in the peripheral plasma of the pregnant ewe. *J. Endocr.* 45, 449-457.

- BASSETT, J.M., THORNBURN, G.D. & WALLACE, A.L.C. (1970) The plasma growth hormone concentration of the foetal lamb. *J. Endocr.* 48, 251-263.
- BATTAGLIA, F.C. & MESCHIA, G. (1978) Principal substrates of foetal metabolism. *Physiol. Rev.* 58, 499-527.
- BAUMAN, G. & NISSLEY, S.P. (1979) Somatomedin generation in response to activated and nonactivated isohormones of hGH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48, 246-250.
- BAXTER, R.C., BROWN, A.S., BRYSON, J.M. & TURTLE, J.R. (1979) Control of liver growth hormone receptors by insulin. In *Proceedings on the International Symposium on Growth Hormone and other biologically active peptides*, p. 18 (abstract), Suppl. 11, Ricerca Scientifica. Eds. A. PECILE & E.E. MULLER. Ed. Educazione Permanente, Milan.
- BAZER, F.W. & THATCHER, W.W. (1977) Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ by the uterine endometrium. *Prostaglandins*. 14, 397-400.
- BECK, P., PARKER, M.L. & DAUGHADAY, W.H. (1965) Radioimmunologic measurement of human placental lactogen in plasma by a double antibody method during normal and diabetic pregnancies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 1457-1462.
- BECKA, S., BILEK, J., SLABA, J., SKARDA, J. & MIKULAS, I. (1977) Some properties of the goat placental lactogen. *Experimentia*. 33, 771-772.
- BEERS, W., STRICKLANDS, S. & REICH, E. (1975) Ovarian Plasminogen Activator relationship to ovulation and hormonal regulation. *Cell*. 6, 387-394.
- BEHRMAN, H.R., MAC DONALD, G.J., GREEP, R.O. (1971 a) Regulation of ovarian cholesterol esters : evidence for the enzymatic sites of prostaglandin-induced loss of corpus luteum function. *Lipids*. 6, 791-796.
- BEHRMAN, H.R., YOSHINAGA, K., GREEP, R.O. (1971 b) Extraluteal effects of prostaglandins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 180, 426-435.
- BELING, C.G., STEWART, M.L. & MARKHAM, S.M. (1970) Functional activity of the corpus luteum following hysterectomy. *J. Clin. Endocr. Metab.* 30, 30-39.
- BELLEVILLE, F., NABET, P. & PAYSANT, P. (1972) Hétérogénéité de l'hormone somatotrophique chorionique (HCS) humaine purifiée. *C.R. Soc. Biol.* 166, 1060-1064.
- BELLEVILLE, F., PAYSANT, P. & NABET, P. (1973) Nature de l'hormone somatotrophique sécrétée in vitro par des cultures de placenta. *C.R. Soc. Biol.* 167, 301-305.
- BEN-DAVID, M., ROBBARD, D., BATES, R.W., BRIDSON, W.E. & CHRAMBACH, A. (1973) Human prolactin in plasma amniotic fluid and pituitary : identity and characterization by criteria of electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrylamide gel. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36, 951-964.
- BENVENISTE, R., STACHURA, M.E., SZABO, M. & FROHMAN, L.A. (1975). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41, 422-425.
- BERTON, J.P. (1971) *Survie foetale après néphrectomie uni ou bilatérale in utero chez le Porc miniature, le Mouton et le Lapin.* *Bull. Assoc. Anatom.* 151, 201-213.

- BINDON, B.M. (1973) Pituitary and ovarian mechanisms in implantation. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 18, 167-175.
- BIRK, Y. & LI, C.H. (1978) Two fragments from fibrinolysin digests of ovine prolactin : characterization and recombination to generate full immunoreactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 2155-2159.
- BJORKMAN, N. (1965) Fine structure of the ovine placentome. *J. of Anatomy.* 99, 283-297.
- BLANK, M.S., CHAN, J.S.O. & FRIESEN, H.G. (1977) Placental lactogens, new developments. *J. Steroid Biochem.* 8, 403-414.
- BLANK, M.S., DUFAU, M.L. & FRIESEN, H.G. (1979) Demonstration of potent gonadotropin like biological activity in the serum of rats during midpregnancy. *Life Sciences.* 25, 1023-1028.
- BLAKE, J., LI, C.H. (1973) Synthesis and growth-promoting activity of N acetyl-hGH (95-136). *Int. J. Peptide Protein Res.* 5, 123-125.
- BLOM, A.K., HOVE, K. & NEDKVITNE, J.J. (1976) Plasma insulin and growth hormone concentrations in pregnant sheep. *Acta. Endocrinol.* 82, 553-560.
- BOIME, I., BOGUSLAWSKI, S. & CAINE, J. (1975) The translation of a Human Placental Lactogen mRNA fraction in heterologous cell-free systems : the synthesis of a possible precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62, 103-109.
- BOLANDER, F.F. & FELLOWS, R.E. (1976 a) Purification and characterization of Bovine Placental Lactogen. *J. Biol. Chem.* 251, 2703-2708.
- BOLANDER, F.F. & FELLOWS, R.E. (1976 b) Growth-promoting and lactogenic activities of Bovine Placental Lactogen. *J. Endocr.* 71, 173-174.
- BOLANDER, F.F. & FELLOWS, R.E. (1976 c) The purification and characterization of Rabbit Placental Lactogen. *Biochem. J.* 159, 775-782.
- BOLANDER, F.F., HURLEY, T.W., HANDWERGER, S. & FELLOWS, R.E. (1976 d) Localisation and specificity of binding of Subprimate Placental Lactogen in rabbit tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 2932-2935.
- BOLANDER, F.F., ULBERG, L.C. & FELLOWS, R.E. (1976 d) Circulating Placental Lactogen levels in dairy and beef cattle. *Endocrinology.* 99, 1273-1278.
- BOLLENGIER, F., HUBINONT, P.O. (1968) Purification de la prolactine placentaire humaine par précipitation sélective au perchlorate de plomb. *C. R. Acad. Sci. Série D.* 267, 653-656.
- BOLT, D.J. (1979) Reduction by human chorionic gonadotropin of the luteolytic effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in ewes. *Prostaglandins.* 18, 387- 396.
- BOLT, D.J. & HAWK, H.W. (1975) Prevention of estrogen induced regression of corpora lutea in ewes by hysterectomy *J. Anim Sci.* 40, 687-690.
- BORJESSON, B.W. & NIALL, H.D. (1979) Lactogenic receptors in sheep mammary gland. In *International Symposium on Growth Hormone and other biologically active peptides.* p. 37 (abstract). Suppl. 11. *Ricerca Scientifica.* Eds. A. PECILE & E.E. MULLER. Ed. Educazione Permanente, Milan.

- BOSHIER, D.P. (1969) A histological and histochemical examination of implantation and early placentome formation in sheep. *J. Reprod. Fert.* 19, 51-61.
- BOURDEL, G., JACQUOT, R. (1959) Effets nutritionnels de la prolactine comparés à l'action des placentas laissés *in utero* chez la Ratte castrée. Etudes des courbes pondérales et des bilans. *C.R. Acad. Sci.* 248, 2249-2251.
- BREUER, C.B. (1969) Stimulation of DNA synthesis in cartilage of hypophysectomized rats by native and modified Placental Lactogen and anabolic hormones. *Endocrinology*. 85, 989-999.
- BREW, K., CAMPBELL, P.N. (1967) Studies on the biosynthesis of protein by lactating guinea-pig mammary gland. *Biochem. J.* 102, 265-274.
- BREW, K., VANAMAN, T.C., HILL, R.L. (1968) The role of α -lactalbumin and the A protein in lactose synthetase : a unique mechanism for the control of a biological reaction. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 59, 491-497.
- BREWER, D.B. (1957) Congenital absence of the pituitary gland and its consequences. *J. Path. Bact.* 73, 59-67.
- BRINSFIELD, T.H. & HAWK, H.W. (1973) Control by progesterone of the concentrations of lipid droplets in epithelial cells of sheep endometrium. *J. Anim. Sci.* 36, 919-922.
- BRUCE, N.W., HILLIER, K. (1974) The effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on ovarian blood flow and corpora lutea regression in the rabbit. *Nature*, 249, 176-177.
- BRYANT, G.D., GREENWOOD, F.C., KANN, G., MARTINET, J., DENAMUR, R. (1971) Plasma prolactin in the estrous cycle of ewe : effect of pituitary stalk section. *J. Endocr.* 51, 405-406.
- BURT, R.L. (1968) Observations bearing on placental lactogenic hormone (HPL) function in pregnancy. In *The Foeto-Placental Unit*. pp. 215-218. Eds. A. PECILE & C. FINZI. Excerpta Medica Found. Amsterdam.
- BUTTLE, H.L., COWIE, A.T., JONES, E.A. & TURVEY, A. (1979) The contribution of placental hormones to the development of the mammary glands in goats. *J. Endocr.* 77, 59 p.
- BUTTLE, H.L. & FORSYTH, I.A. (1976) Placental Lactogen in cow. *J. Endocr.* 68, 141-146.
- BUTTLE, H.L., FORSYTH, I.A., KNAGGS, G.S. (1972) Plasma prolactin measured by radioimmunoassay and bioassay in pregnant and lactating goats and the occurrence of a Placental Lactogen. *J. Endocr.* 53, 483-491.
- CARDELL, B.S. (1953) Infants of diabetic mothers. A morphological study. *Brit. J. Obstet. Gynaec.* 60, 834-835.
- CARON, M.G., GOLDSTEIN, S., SAVARD, K., MARSH, J.M. (1975) Protein kinase stimulation of a reconstituted cholesterol side chain cleavage enzyme system in the bovine corpus luteum. *J. Biol. Chem.* 250, 5137-5143.
- CASTRACANE, V.D. & JORDAN, V.C. (1976) Consideration into the mechanism of estrogen-stimulated uterine prostaglandin synthesis. *Prostaglandins*. 12, 243-251.

- CATT, K.J., DUFAU, M.L., VAITUKAITIS, J.L. (1975) Appearance of hCG in pregnancy plasma following the initiation of implantation of the blastocyst. *J. Clin. Endocr. Metab.* 40, 537-540.
- CATT, K.J., MOFFATT, B., NIALL, H.D. (1967) Human growth hormone and placental lactogen : structural similarity. *Science*. 157, 3786, 321.
- CERRUTI, R.A., LYONS, W.R. (1960) Mammogenic activities of the midgestational mouse placenta. *Endocrinology*. 67, 884-887.
- CHAKRIYARAT, S., HEAD, H.H., THATCHER, W.W., BACHMAN, K.C., WILCOX, C.J. (1975) Lactational responses of ovariectomized cows to two hormonal injection schemes. *J. Dairy Sci.* 58, 140.
- CHAKRIYARAT, S., HEAD, H.H., THATCHER, W.W., NEAL, F.C., WILCOX, C.J. (1978) Induction of lactation : lactational, physiological and hormonal responses in the bovine. *J. Dairy Sci.* 61, 1715-1724.
- CHALLIS, J.R.G. (1971) Sharp increase in free circulating oestrogens immediately before parturition in sheep. *Nature. Lond.* 289, 208.
- CHALLIS, J.R.G., DAVIES, I.J. & RYAN, K.J. (1973) The concentrations of progesterone, estrone and estradiol-17 β in the plasma of pregnant rabbits. *Endocrinology*. 93, 971-976.
- CHAMLEY, W.A., CERINI, J.C. and the late GODING, J.R. (1973) Luteal function in sheep with ovarian autotransplants given concurrent infusions of prolactin and prostaglandin F_{2 α} into the ovarian artery. *Prostaglandins*. 4, 711-716.
- CHAN, J.S.D., ROBERTSON, H.A. & FRIESEN, H.G. (1976) The purification and characterization of Ovine Placental Lactogen. *Endocrinology*. 98, 65-76.
- CHAN, J.S.D., ROBERTSON, H.A. & FRIESEN, H.G. (1978 a) Distribution of binding sites for Ovine Placental Lactogen in the sheep. *Endocrinology*. 102, 632-640.
- CHAN, J.S.D., ROBERTSON, H.A. & FRIESEN, H.G. (1978 b) Maternal and fetal concentration of Ovine Placental Lactogen measured by radioimmunoassay. *Endocrinology*. 102, 1606-1613.
- CHAN, D.W. & SLAUNWHITE, W.R. (1977) The chemistry of human transcortin. The effects of pH, Urea, Salt, Temperature on the binding of cortisol and progesterone. *Arch. Bioch. Biophys.* 182, 437-442.
- CHARRIER, J. (1973) Evolution foetale et postnatale du contenu en hormone de croissance de l'hypophyse ovine. *Annls. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 13, 155-163.
- CHARRIER, J. (1978) Age dependant variations of Somatomedin-A activity in the rabbit. *Annls. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 18, 33-43.
- CHARRIER, J. (1979) Somatomedin-A bioactivity in serum and amniotic fluid in fetal pig and rabbit. In *Proc. on the Int. Symp. on Growth Hormone and other biologically active peptides*. p.56(abstract) Suppl. 11. Eds. A. PECILE & E.E. MULLER. *Ricerca Scientifica. Ed. Educazione Permanente*, Milan.
- CHARRIER, J. (1979) Somatomedin-A (Sm-A) Bioactivity in serum and amniotic fluid as related to weight in fetal pig. *Annls. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* (sous presse).

- CHATTERJEE, M., LAGA, E.M., MERRILL, C.C. & MUNRO, H.N. (1977) Microheterogeneity of Human Placental Lactogen showing different patterns in individuals. *Biochim. Biophys. Acta.* 493, 332-339.
- CHEZ, R.A., HUTCHINSON, D.A., SALAZAR, H & MINTZ, D.H. (1970) Some effects of fetal and maternal hypophysectomy in pregnancy. *Ann. J. Obstet. Gynecol.* 108, 643-650.
- CHO, D.Y. & LEIPOLD, H.W. (1978) Anencephaly in calves. *Cornell Vet.* 68, 60-69.
- CHRAMBACH, A., YADLEY, R.A., BEN-DAVID, M. & RODBARD, D. (1973) Isohormones of Human Growth Hormone I. Characterization by electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrylamide gel. *Endocrinology.* 93, 848-857.
- CLARKE, W.C., FARMER, S.W. & HARTWELL, K.M. (1977) Effect of Teleost pituitary Growth Hormone on growth of *Tilapia mossambica* and on growth and seawater adaptation of Socheye Salmon (*Oncorhynchus nerka*) Gen. Comp. Endocr. 27, 240-253.
- CLAUSER, H. (1974) Métabolisme intermédiaire. Oxydations. Phosphorylations. In *Biochimie*. pp. 607-704. Eds. F. CHAPEVILLE & H. CLAUSER, et coll. Ed, HERMANN, Paris.
- COGHLAN, J.P., FAN, J.S.K., SCOGGINS, B.A. & SHULKES, A.A. (1977) Measurement of extracellular fluid volume and blood volume in sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 30, 71-84.
- COHEN, S. (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating in cisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* 237, 1555-1562.
- COHEN, R.M. & GALA, R.R. (1969) Detection of luteotrophic and mammatropic activity in serum of rats at midpregnancy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 132, 683-685.
- COHEN, H., GRUMBACH, M.M., KAPLAN, S.L. (1964) Preparation of human chorionic "Growth hormone-Prolactine". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 117, 438-441.
- COMLINE, R.S. & SILVER, M. (1970) Daily changes in foetal and maternal blood of conscious pregnant ewes, with catheters in umbilical and uterine vessels. *J. Physiol.* 209, 567-586.
- CONTOPOULOS, A.N., SIMPSON, M.E. (1959) Growth promoting activity of pregnant rat plasma after hypophysectomy and after thyroidectomy. *Endocrinology.* 64, 1023-1031.
- CONTRACTOR, S.F., BANKS, R.W., JONES, C.J.P. & FOX H (1977) A possible role for placental lysosomes in the formation of villous syncytiotrophoblast. *Cell & Tissue Res.* 178, 411-419.
- COPPENS, Y. (1976) Origines de l'Homme. pp. 11-13. Ed. Musée de l'Homme, Paris.
- COOK, H.W. & LANDS, W.E.M. (1976) Mechanism for suppression of cellular biosynthesis of prostaglandins. *Nature.* 260, 630-632.
- COSTLOW, M.E., BUSCHOW, R.A. & Mc GUIRE, W.L. (1975) Prolactin stimulation of prolactin receptors in rat liver. *Life Sci.* 17, 1457-1466.
- COTES, P.M. & DAS, R.E.G. (1978) An international collaborative study of the assay of Human Placental Lactogen : establishment of WHO International reference preparation of Human Placental Lactogen. *Brit. J. Obstet. Gyn.* 85, 451-459.
- COUDERT, S.P. & SHORT, R.V. (1966) Prolongation of the functional life of the corpus luteum in sheep with experimental uterine infections. *J. Reprod. Fert.* 12, 579-582.
- COX, R.I., THORNBURN, G.D., CURRIE, W.B., RESTALL, B.J. & SCHNEIDER, W. (1972) Prostaglandin F group (PGF) progesterone and estrogen concentration in the utero-ovarian venous plasma of the conscious ewe during the estrous cycle. *Adv. Biosci.* 9, 625-630.

CURRIE, W.B., KELLY, P.A., FRIESEN, H.G. & THORNBURN, G.D. (1977) Caprine Placental Lactogen : levels of prolactin-like and growth hormone-like activities in the circulation of pregnant goats determined by radioreceptor assays. *J. Endocr.* 73, 215-226.

DAHL, J.L. & HOKIN, L.E. (1974) The sodium-potassium ATPase. *Annls. Rev. Biochem.* 43, 327-356.

DAURAT-LARROQUE, S.T., MOYA PORTUGUES, M.E., SANTOME, J.A. (1977) Reaction of bovine and equine growth hormones with tetranitromethane. *Int. J. Peptide Protein Res.* 9, 119-128.

DAVIS, B.J. (1964) Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.

DAYHOFF, M.O., ECK, R.V., PARK, C.M. (1972) A model of evolutionary change in proteins. In *Atlas of Protein Sequence and Structure*. pp. 89-99, Vol. 5, Ed. National Biomedical Research Foundation, Washington.

DE LA LLOSA-HERMIER, M.P., LEBoulLEUX, P., EVRARD, M. & HERMIER, C. (1979) In vitro effect of prolactin, prostaglandin $F_{2\alpha}$ and cycloheximide on 20α -dihydro-progesterone synthesis in pseudo-pregnant rat ovaries. *J. Steroid Biochem.* 10, 689-693.

DELOUIS, C., DENAMUR, R. (1967) Induction expérimentale de la sécrétion lactée pendant la gestation de la Brebis. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 264, 2493-2496.

DELOUIS, C., DJIANE, J., KANN, G., TERQUI, M. & HEAD, H.H. (1978) Induced lactation in cows and heifers by short-term treatment with steroid hormones. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 18, 721-734.

DEL POZO, E. & FLUCKIGER, E. (1973) Prolactin inhibition experimental and clinical studies. In *Human Prolactin*. p. 291. Eds. J.L. PASTEELS & C. ROBYN. Ed. Excerpta Medica, Amsterdam.

DENAMUR, R. (1963) Les acides nucléiques de la glande mammaire pendant la gestation et la lactation de la Lapine. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 256, 4748-4751.

DENAMUR, R. (1965) Les acides nucléiques et les nucléotides libres de la glande mammaire pendant la lactogénèse et la galactopoïèse. In *Proc. 2nd Int. Congr. Endocr.*, Lond. (1964). pp. 434-462. Part. I. I.C.S. N° 83. Excerpta Medica, Amsterdam.

R. DENAMUR (1969) Comparative aspects of hormonal control in lactogenesis. In *Proc. 3rd Intern. Cong. Endocr.*, Mexico. Excerpta Medica n° 184, Progress in Endocrinology. pp. 959-972.

DENAMUR, R. (1971) Hormonal control of lactogenesis. *J. Dairy Res.* 38, 237-264.

DENAMUR, R. (1973) Facteurs lutéotrophiques chez la Brebis. In *Le Corps Jaune*. pp. 213-223. Eds. R. DENAMUR & A. NETTER. Masson, PARIS.

DENAMUR, R. & DELOUIS, C. (1972) Effects of progesterone and prolactin on the secretory activity and the nucleic acid content of the mammary gland of pregnant rabbits. *Acta Endocrinologia.* 70, 603-618.

DENAMUR, R. & KANN, G. (1973) Luteolytic effects of oestradiol after hypophysectomy or pituitary stalk section in cycling sheep. *Acta Endocr., Copenh.* 73, 635-642.

- DENAMUR, R., KANN, G. & SHORT, R.V. (1971) How does the corpus luteum of the sheep know that there is an embryo in the uterus? In *Studies in the Sheep : the Endocrinology of Pregnancy and Parturition*. pp. 2-4. Ed. C.G. Pierrepont. Alpha Omega Alpha, Cardiff.
- DENAMUR, R. & MARTINET, J. (1955) Effets de l'ovariectomie chez la Brebis pendant la gestation. *C.R. Séance Soc. Biol.* 149, 2105-2107.
- DENAMUR, R. & MARTINET, J. (1961) Effets de l'hypophysectomie et de la section de la tige pituitaire sur la gestation de la Brebis. *Ann. Endocrinol.* 22, 755-759.
- DENAMUR, R. & MARTINET, J. (1970) Nature des hormones antéhypophysaires stimulantes de la sécrétion lactée chez la Brebis normale. *Arch. Int. Pharm. Théor.* 186, 185-187.
- DENAMUR, R., MARTINET, J. & SHORT, R.V. (1973) Pituitary control of the ovine corpus luteum. *J. Reprod. Fert.* 32, 207-220.
- DEVINOY, E., HOUEBINE, L.M. & OLLIVIER-BOUSQUET, M. (1979) Role of glucocorticoids and progesterone in the development of rough endoplasmic reticulum involved in casein biosynthesis. *Biochimie.* 61, 453-461.
- DJIANE, J. & DURAND, P. (1977) Prolactin-progesterone antagonism in self regulation of prolactin receptors in the mammary gland. *Nature* 266, 641-643.
- DJIANE, J., DURAND, P. & KELLY, P.A. (1977) Evolution of prolactin receptors in rabbit mammary gland during pregnancy and lactation. *Endocrinology.* 100, 1348-1356.
- DJIANE, J. & KANN, G. (1975) Mise en évidence de l'activité lactogène et mesure dans le sérum de l'activité prolactinique du placenta chez la Brebis au cours de la gestation. *C.R. Hebd. Séance Acad. Sci., Paris.* 280, 2785-2788.
- DJIANE, J., KANN, G., DELOUIS, C. & MARTAL, J. (1975) Placental Lactogenic hormone : plasma levels in Ruminants, study of its role on mammatogenesis and lactogenesis in the ewe. *Proc. int. Symp. on Growth hormone and related peptides*, Milan, Suppl.1, p.128, *Ric. Sci. Ed., Educazione Permanente*, Milan. C₁₀x
- DINEEN, J.K., KELLY, J.D., GOODRICH, B.S. & SMITH, I.D. (1974) An inhibitor of the action of prostaglandins in sheep and human semen. *Prostaglandins.* 5, 209-220.
- DONEEN, B.A. (1976) Biological activities of mammalian and teleostean prolactins and growth hormones on mouse mammary gland and teleost urinary bladder. *Gen. Comp. Endocrinol.* 30, 34-42.
- DUBOIS, M.P. (1969) Cytologie de l'hypophyse de bovins : séparation des cellules somatotropes et des cellules à prolactine par immunofluorescence. *Bull. Ass. Anat., Nancy.* 145, 139-146.
- DUBOIS, M.P. & KOLODZIEJCZYK, E. (1975) Centres hypothalamiques du Rat sécrétant la somatostatine. Répartition des paracaryons en deux systèmes magno et parvo-cellulaires. (Etudes immunocytologiques). *C.R. Acad. Sci., Paris.* 281, 1737-1740.
- DUBOIS, M., MARTAL, J. & DJIANE, J. (1976) Immunofluorescence localization of placental lactogen. In *Proc. 5th Int. Endocrinology*, Hamburg, p.25, Brühlsche Universitätsdruckerei, Giessen. C₁₂
- DUNN, M.J. & HOOD, V.L. (1977) Prostaglandins and the kidney. *Ann. J. Physiol.* 233, 169-184.
- DUPOUY, J.P., DUBOIS, M.P. (1975) Ontogenesis of the α MSH, β MSH and ACTH cells in the foetal hypophysis of the rat. Correlation with the growth of the adrenals and the adrenocortical activity. *Cell Tissue Res.* 161, 374-384.
- DURAND, P. & DJIANE, J. (1977) Lactogenic activity in the serum of rabbits during pregnancy and early lactation. *J. Endocr.* 75, 33-42.

- EBNER, K.E., DENTON, W.L., BRODBECK, K.U. (1966) The substitution of -lactalbumin for the B protein of lactose synthetase. *Biochem. Res. Commun.* 24, 232-236.
- EDEY, T.N. (1967) Early embryonic death and subsequent cycle length in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 13, 437-443.
- EDGAR, D.G. & RONALDSON, J.W. (1958) Blood levels of progesterone in the ewe. *J. Endocr.* 16, 378-384.
- EDMUNDSON, A.B. & HIRS, C.H.W. (1962) On the structure of sperm whale myoglobin. *J. Molec. Biol.* 5, 663-682.
- EDWARDS, E.M., DHAND, U.K., JEACOCK, M.K. & SHEPHERD, D.A.L. (1975) Activities of enzymes concerned with pyruvate and oxaloacetate metabolism in the heart and liver of developing sheep. *Biochim. Biophys. Acta.* 339, 217-277.
- EISENBARTH, G.S. & LEOVITZ, H.E. (1974) Isolation and characterization of a serum inhibitor of cartilage metabolism. *Endocrinology.* 95, 1600-1607.
- ELLINWOOD, W.E., NETT, T.M. & NISWENDER, G.D. (1979) Maintenance of the corpus luteum of early pregnancy in the ewe. I. Luteotropic properties of embryonic homogenates. *Biol. Reprod.* 21, 281-288.
- ELLIS, G.J., MARLER, E., CHEN, H.C. & WILHELMI, A.E. (1966) Molecular weight of bovine, porcine and human growth hormone by sedimentation equilibrium. *Fed. Proc.* 25, 348. (abstract).
- FALCONER, J., FORBES, J.M., HART, I.C., ROBINSON, J.S., THORNBURN, G. (1977). Somatomedin activity in foetal sheep following hypophysectomy or after reduction of placental size by removal of endometrial caruncles. *J. Endocr.* 75, 18P-19P.
- FARMER, S.W., LICHT, P. & PAPKOFF, H. (1977 a) Biological activity of Bullfrog Growth Hormone in the Rat and the Bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Endocrinology.* 101, 1145-1150.
- FARMER, S.W., PAPKOFF, H., BEWLEY, T.A., HAYASHIDA, T., NISHIOKA, R.S., BERN, H.A. & LI, C.H. (1977 b) Isolation and properties of Teleost Prolactin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 31, 6071.
- FARMER, S.W., PAPKOFF, H., HAYASHIDA, T., BEWLEY, T.A., BERN, H.A., & LI, C.H. (1976 a) Purification and properties of Teleost Growth Hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 30, 91-100.
- FARMER, S.W., PAPKOFF, H. & HAYASHIDA, T. (1976 b) Purification and properties of Reptilian and Amphibian Growth Hormones. *Endocrinology.* 99, 692-700.
- FEE, B.A., WEILL, W.B. (1963) Body composition of infants of diabetic mothers by direct analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 110, 869-897.
- FELBER, J.P., ZARAGOZA, N., BENUZZI-BADONI, M. & GENAZZANI, A.R. (1972) The double effect of Human Chorionic Somatomammotropin (HCS) and pregnancy on lipogenesis and on lipolysis in the isolated rat epididymal fat pad and fat pad cells. *Horm. Metab. Res.* 4, 293-296.

- FELLOWS, R.E., BOLANDER, F.F., HURLEY, T.W., HANDWERGER, S. (1975) Isolation and characterization of Bovine and Ovine Placental Lactogen. In Proc. 3rd Int. Symp. Milan. pp. 315-326. In Growth Hormone and Related Peptide. Eds. A. PECILE & E.E. MULLER. Excerpta Medica Found. Amsterdam
- FEVRE, J. (1967) Oestrogènes urinaires chez la Brebis gestante ovariectomisée. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 7, 29-32.
- FEVRE, J. (1974) Corticostéroïdes en fin de gestation chez quelques mammifères. In Avortement et Parturition provoqués. pp. 59-70. Eds. M.J. BOSC, R. PALMER, C. SUREAU. Masson & cie, Paris.
- FITZGERALD D.K., COLVIN, B., MAWAL, R. & EBNER, K.E. (1970) Enzymic assay for galactosyl transferase activity of lactose synthetase and α -lactalbumin in purified and crude systems. Analatycal Biochem. 36, 43-61.
- FLECHON, J.E., GUILLOMOT, M. & WINTENBERGER-TORRES, S. (1978) Etude ultrastructurale du blastocyste et de l'implantation chez la Brebis. In Implantation de l'Oeuf. pp. 107-119. Eds. F. DU MESNIL DU BUISSON, A. PSYCHOVOS & K. THOMAS. Masson, Paris.
- FLINT, A.P.F., HENVILLE, A. & CHRISTIE, W.B. (1979) Presence of placental lactogen in bovine conceptuses before attachment. J. Reprod. Fert. 56, 305-308.
- FLORINI, J.R., TONELLI, G., BREUER, C.B., COPPOLA, J., RINGLER, I. & BELL, P.H. (1966) Characterization and biological effects of purified placental protein (human). Endocrinology. 79, 692-708.
- FOGWELL, R.L., FORD, S.P., BUTCHER, R.L., THAYNE, W.V. & INSKEEP, E.K. (1977) PGF_{2 α} and its metabolites in uterine and jugular venous plasma and endometrium of ewes during early pregnancy. J. Anim. Sci. 45, 320-327.
- FOOTE, W.D., GOOCH, L.D., POPE, A.L. & CASIDA, L.E. (1957) The maintenance of early pregnancy in the ovariectomized ewe by injection of ovarian hormones. J. Anim. Sci. 16, 986-989.
- FORSYTH, I.A. (1967) Prolactin and Placental Lactogen. In Hormones in Blood. pp. 233-272, Vol. I. Eds. C.H. GRAY & A.L. BACHARACH. Academic Press, Lond. N.Y.
- FORSYTH, I.A. (1972) Use of a rabbit mammary gland organ culture system to detect lactogenic activity in blood. In Lactogenic Hormones. pp. 151-167. Eds. G. E.W. WOLSTENHOLME & J. KNIGHT. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- FORSYTH, I.A. (1973) Secretion of a prolactin-like hormone by the placenta in Ruminants. In Le Corps Jaune. pp. 239-255. Eds. R. DENAMUR & A. NETTER. Masson, Paris.
- FORSYTH, I.A. (1974) The comparative study of placental lactogenic hormones : a review. In Lactogenic Hormones, Fetal Nutrition and Lactation. pp. 49-67. Eds. J.B. JOSIMOVICH, M. REYNOLDS & E. COBO. J. Wiley & Sons, New-York.
- FORSYTH, I.A. & BUTTLE, H.L. (1972) Placental Lactogen in ruminants. Proc. IV Int. Cong. Endocrinology, Washington D.C., 1972, I.C.S. N°256, p. 106. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam.
- FRANCIS, M.J.O. & HILL, D.J. (1975) Prolactin stimulated production of somatomedin by rat liver. Nature. 255, 167-168.

- FRIESEN, H. (1965) Purification of placental factor with immunological and chemical similarity to human growth hormone. *Endocrinology*, 76, 369-381.
- FRIESEN, H., TOLLIS, G., SHU¹ R. & HWANG, P. (1973) Studies on human prolactin : chemical radioreceptor assay and clinical significance. In *Human Prolactin*. pp. 11-23. Ed. J.L. PASTEELS & C. ROBYNS. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam.
- FROESCH, E.R., ZAPF, J., RINDERKNECHT, E., KAUFMANN, U., MEULI, C., SCHOENLE, E. & HUMBEL, R.E. (1976) Chemical, biological and physiological characterization of NSILA. Eds. V.H.T. JAMES. *Proc. V Intern. Cong. Endocrinology*, Hamburg. pp. 167-172, Vol. 2. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam-Oxford, 1977.
- FUJISHIMA, M. (1961) Studies on somatotrophic hormone secretion in gynecology and obstetrics. *J. Exp. Med. Jap.* 74, 161-174.
- FYLLING, P. (1970) The effect of pregnancy, ovariectomy and parturition on plasma progesterone level in sheep. *Acta Endocrinol.* 65, 273-283.
- GARLAND, J.T., JENNINGS, J. & BUCHANAN, F. (1979) A modified pelvic leaflet assay allows simultaneous quantitation of thymidine and sulfate incorporation and reveals differences in their control. In *Proceeding on the Inter. Symp. on Growth Hormone and other biologically active peptides*, Milan. Eds. A. PECILE & E.E. MULLER. p. 52, (abstract), Suppl. 11. *Ricerca Scientifica*. Ed. Educazione Permanente, Milan.
- GAYE, P., GAUTRON, J.P., MERCIER, J.C. & HAZE, G. (1977) Amino terminal sequences of the precursors of ovine caseins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 903-911.
- GAYE, P., HOUEBINE, L.M. (1975) Isolation and characterization of casein mRNA_s from lactating ewe mammary glands. *Nucleic Acids Res.* 2, 707-722.
- GENAZZANNI, A.R., BENUZZI-BADONI, M. & FELBER, J.P. (1969) Human chorionic somatomammotropin (HCSM) : lipolytic action of a pure preparation on isolated fat cells. *Metabolism* 18, 593-598.
- GENAZZANI, A.R., FRAIOLI, F., HURLIMANN, J., FIORETTI, P., FELBER, J.P. (1975) Immunoreactive ACTH and cortisol plasma levels during pregnancy. Detection and partial purification of corticotrophin-like placental hormone : the human chorionic corticotrophin (HCC). *Clin. Endocr.* 4(1), 1-14.
- GERASIMO, P., DJIANE, J. & KELLY, P.A. (1979) Titration of total binding sites for growth hormone in rabbit liver. *Mol. Cell. Endocrinology*, 13, 11-23.
- GIBBONS, J.M., MITNICK, M. CHIEFFO (1975) In vitro biosynthesis of TSH-RF and LH-RF by the human placenta. *Am. J. Obstet. Gynaec.* 121 (1), 127-131.
- GIRARD, J.R., RIEUTORT, M., KERVAN, A. & JOST, A. (1976) Hormonal control of fetal growth with particular reference to insulin and growth control. In *Perinatal Medicine*. pp. 197-202. Eds. G. ROTH & L.E. BRATTEBY. Almqvist and Wiksell, Stockholm.
- GLUCKMAN, P.D. & BRINSMEAD, M.W. (1976) Somatomedin in cord blood : relationship to gestational age and birth size. *J. Clin. Endocr. Metab.* 43, 1378-1381.
- GLUCKMAN, P.D., KAPLAN, S.L., RUDOLPH, A.M. & GRUMBACH, M.M. (1979) Hormone Ontogeny in the ovine fetus. II. Ovine Chorionic Somatomammotropin in mid- and late gestation in the fetal and maternal circulation. *Endocrinology*. 104, 1828-1833.

- GODING, J.R. (1973) The demonstration that PGF_{1 α} is the uterine luteolysin in the ewe. In *Le Corps Jaune*, pp. 311-323. Eds. R. DENAMUR & A. NETTER. Masson, Paris.
- GODKIN, J.D., COTE, C. & DUBY, R.T. (1978) Embryonic stimulation of ovine and bovine corpora lutea. *J. Reprod. Fert.* 54, 375-378.
- GOLANDER, A., HURLEY, T., BARRETT, J., HIZI, A. & HANDWERGER, S. (1978) Prolactin synthesis by human chorion-decidual tissue : a possible source of prolactin in the amniotic fluid. *Science*. 202, 311-313.
- GOODMAN, A.D., TANNENBAUM, R. & RABINOWITZ, D. (1972) Existence of two forms of immunoreactive growth hormone in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 35, 868-878.
- GORDEN, P., HENDRICKS, C.M. & ROTH, J. (1973) Evidence for "big" and "little" components of human plasma and pituitary growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36, 178-184.
- GORDON, W.G., BASCH, J.J. & KALAN, E.B. (1961) Amino acid composition of β -lactoglobulin A, B and AB. *J. Biol. Chem.* 236, 2908-2911.
- GOSPODAROWICZ, D. (1973) Properties of the luteinizing hormone receptor of isolated bovine corpus luteum plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 248, 5042-5049.
- GOSPODAROWICZ, D. (1974) Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature, Lond.* 249, 123-127.
- GRAF, L. & LI, C.H. (1974) On the primary structure of pituitary bovine growth hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56, 168-176.
- GRINWICH, D.L., HICHENS, M., BEHRMAN, H.R. (1976) Control of the LH receptor by prolactin and prostaglandin F_{2 α} in rat corpora lutea. *Biol. Reprod.* 14, 212-218.
- GRUMBACH, M.M., KAPLAN, S.L., ABRAMS, C.L., BELL, J.J. & CONTE, F.A. (1966) Plasma free fatty acid response to the administration of chorionic "growth hormone-prolactin". *J. Clin. Endocr.* 26, 478-482.
- GRUMBACH, M.M., KAPLAN, S.L., SCIARRA, J.J., BURR, I.M. (1968) Chorionic growth hormone-prolactin (CGP) : secretion, disposition biologic activity in Man, and postulated function as the "growth hormone" of the second half of pregnancy. *Annls. N.Y. Acad. Sci.* 148, 501-531.
- GUSTAVII, B. (1975) Release of lysosomal acid phosphatase into the cytoplasm of decidual cells before the onset of labour in humans. *Br. J. Obstet. Gynaec.* 82, 177-181.
- GUYDA, H.J. (1975) Heterogeneity of Human Growth Hormone and Prolactin secreted in vitro immunoassay and radioreceptor assay correlation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41, 955-967.

- HAFS, H.D., PURCHAS, R.W. & PEARSON, A.M. (1971) A review : relationships of some hormones to growth and carcass quality of Ruminants. *J. Anim. Sci.* 33, 64-71.
- HALL, K. (1970) Quantitative determination of the sulfation activity in human serum. *Acta Endocr. Copenh.* 63, 338-350.
- HALL, K., LUFT, R. & TAKANO, K. (1976) Radioligand assay of Somatostatin. In *Proc. Vth Intern. Cong. Endocrinology, Hamburg*. pp. 162-166, Vol. 2. Ed. V.H.I. JAMES. Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, (1977).
- HAMBLEY, J. & GRANT, D.B. (1972) Apparent heterogeneity of serum chorionic sommatomammotrophin on gel filtration. *Acta Endocrinologica, Copenh.* 70, 43-47.
- HAMILTON, D.W., ALLEN, W.R. & MOOR, R.M. (1973) The origin of equine endometrial cups. III. A light and electron microscope study of fully developed equine endometrial cups. *Anat. Rec.* 177, 503-517.
- HANDWERGER, S., CRENSHAW, C., MAURER, W.F., BARRETT, J., HURLEY, T.W., GOLANDER, A. & FELLOWS, R.E. (1977) Studies on ovine Placental Lactogen secretion by homologous radioimmunoassay. *J. Endocr.* 72, 27-34.
- HANDWERGER, S., FELLOWS, R.E., CRENSHAW, M.C., T., BARRETT, J. & MAURER, W.F. (1976) Ovine Placental Lactogen : acute effects on intermediary metabolism in pregnant and non-pregnant sheep. *J. Endocrinol.* 69, 133-137.
- HANDWERGER, S., MAURER, W., BARRETT, J., HURLEY, T. & FELLOWS, R.E., (1974) Evidence for homology between Ovine and Human Placental Lactogens. *Endocr. Res. Commun.* 1, 403-413.
- HANSEL, W., CONCANNON, P.W., LUKASZEWSKA, J.H. (1973) Corpora lutea of the large domestic animals. *Biol. Reprod.* 8, 222-245.
- HAOUR, F., SAXENA, B.B. (1974) Characterization and solubilisation of gonadotropin receptor of bovine corpus luteum. *J. Biol. Chem.* 249, 2195-2205.
- HAOUR, F., SAXENA, B.B. (1974) Detection of gonadotropin in the rabbit blastocyst before implantation. *Science*. 185, 444-445.
- HAOUR, F., TELL, G., SANCHEZ, P. (1976) Mise en évidence et dosage d'une gonadotrophine chorionique chez le Rat. *C.R. Acad. Sci. (Sér. D)*. 282, 1183-1186.
- HARRISON, F.A., HEAP, R.B., HORTON, E.W. & POYSER, N.L. (1972) Identification of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in uterine fluid from the non-pregnant sheep with an autotransplanted ovary. *J. Endocr.* 53, 215-222.

- HARTMANN, P.E., TREVETHAN, P. & SHELTON, J.N. (1973) Progesterone and oestrogen and the initiation of lactation in ewes. *J. Endocr.* 59, 249-259.
- HASHIMOTO, I., ASANO, T. & WIEST, W. (1975) Progestational function of perfused rat corpora lutea. *Endocrinology*, 96, 421-430.
- HAYDEN, T.J., THOMAS, C.R. & FORSYTH, I.A. (1979a) Effect of number of young born (Litter size) on milk yield of goats : role for Placental Lactogen. *J. Dairy Sci.* 62, 53-57.
- HAYDEN, T.J., THOMAS, C.R., SMITH, S.V. & FORSYTH, I.A. (1979 b) Placental Lactogen in the goat in relation to stage of gestation, number of fetuses, metabolites, progesterone, and time of day. *J. Endocr.* (sous presse).
- HAYE, B., CHAMPION, S. & JACQUEMIN, C. (1973) Control by TSH of a phospholipase A2 activity, a limiting factor in the biosynthesis of prostaglandins in the thyroid. *Febs Lett.* 30, 253-260.
- HEINRICH, U.E., DRAZNIN, B., JOHNSON, C.J., SCHALCH, D.S. (1978) NSILA (Non suppressible Insulin-like Activity) and fetal growth. *Int. Symp. Somatomedins and growth. Santa Margherita Ligure, Italy. Abstract.* 47.
- HEITZMAN, R.J. (1967) Enzymes of lactose synthesis in the mammary glands of normal and hormonally treated rabbits. *Biochem. J.* 104, 24-25.
- HEITZMAN, R.J. (1968) Enzymes of lactose biosynthesis in normal and hormonally stimulated rabbit mammary glands. *J. Endocr.* 40, 81-84.
- HENDERSON, K.M., SCARAMUZZI, R.J. & BAIRD, D.T. (1977) Simultaneous infusion of prostaglandin E2 antagonizes the luteolytic action of prostaglandin F_{2α} in vivo. *J. Endocr.* 72, 379-383.
- HENNEN, G., PIERCE, J.G. & FREYCHET, P. (1969) Human chorionic Thyrotropin further characterization and study of its secretion during pregnancy. *J. Clin. Endocr. Metab.* 29, 581-594.
- HENBY, C.N. (1975) Distribution studies on the reduction of prostaglandin E2 to prostaglandin F_{2α} by tissue homogenates. *Biochim. Biophys. Acta.* 409, 225-234.
- HERLITZ, H., HAMBERGER, L., ROSBERG, S., AHREN, K. (1974) Cyclic AMP in isolated corpora lutea of the rat influence of gonadotropins and prostaglandins. *Acta Endocrinol.* 77, 737-752.
- HERMIER, C. (1973) Mode d'action de l'hormone lutéinisante (LH) sur le corps jaune. In *Le Corps Jaune*. pp. 289-296. Masson, Paris.
- HERMIER, C., JUTISZ, M. (1969) Biosynthèse de la progestérone in vitro dans le corps jaune de la ratte pseudogestante : influence du Ca²⁺ et du Mg²⁺ sur les effets stimulants dus à l'hormone lutéinisante, à l'Adénosine-3'5'-Monophosphate cyclique ou à un accroissement de la concentration en potassium. *Biochim. Biophys. Acta.* 192, 96-105.

- HERMIER, C., SANTOS, A.A., WISNEWSKY, C., NETTER, A., JUTISZ, M. (1972) Rôle de l'AMPC et d'une protéine régulatrice dans l'action in vitro de la gonadotropine choriale humaine (hCG) sur le corps jaune humain. C.R. Acad. Sci. 275 (Sér. D), 1415-1418.
- HERMIER, C., TERTRIN-CLARY, C., DE LA LLOSA, P., JUTISZ, M. (1971) Action comparée de l'hormone lutéinisante (LH) ovine et de ses sous-unités sur la biosynthèse de la progestérone in vitro. C.R. Acad. Sci. 273 (Sér. D), 966-969.
- HERSHMAN, J.M. & STARNES, W.R. (1969) Extraction and characterization of a thyrotropic material from the human placenta. J. Clin. Invest. 48, 923-929.
- HERSHMAN, J.M., STARNES, W.R. (1971) Placental Content and characterization of Human Chorionic Thyrotropin. J. Clin. Endocr. 32, 52-58.
- HICHENS, M., GRINWICH, D.I., BEHRMAN, H.R. (1974) $\text{PGF}_{2\alpha}$ induced loss of corpus luteum gonadotrophin receptors. Prostaglandins. 7, 449-458.
- HIGASHI, K. (1961) Studies on the Prolactin-like substance in human Placenta (III). Endocrin. Jap. 8, 288-296.
- HIGASHI, K. (1962) Studies on the Prolactin-like substance in human placenta (IV). Endocrin. Jap. 9, 1-11.
- HODGEN, G.D., NIEMAN, W.J., TULLNER, W.W. (1975) Duration of chorionic gonadotropin production by the placenta of the rhesus monkey. Endocrinology. 96, 789-791.
- HODGETTS, V.E. (1961) The dynamic red cells storage function of the spleen in sheep. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 39, 187-196.
- HOLDER, A.T. & WALLIS, M. (1977) Actions of growth hormone, prolactin and thyroxine on serum somatomedin-like activity and growth in hypopituitary dwarf mice. J. Endocr. 74, 223-229.
- HOLT, J.A., RICHARDS, J.S., MIDGLEY, A.R. Jr., REICHERT, I.E. Jr. (1976) Effect of prolactin on LH receptors in rat luteal cells. Endocrinology. 98, 1005-1013.
- HOPKINS, P.S. & THORNBURN, G.D. (1972) The effects of fetal thyroidectomy on the development of the ovine fetus. J. Endocrinol. 54, 55-66.
- HOUEBINE, L.M. (1979) Role of prolactin in the expression of casein genes in the virgin rabbit. Cell Differentiation. 8, 49-59.
- HOUEBINE, L.M. & GAYE, P. (1975) Regulation of casein synthesis in the rabbit mammary gland. Titration of mRNA activity for casein under prolactin and progesterone treatment. Mol. Cell. Endocrinol. 3, 37-55.
- HUNT, L.T. & DAYHOFF, M.O. (1976) Prolactin, Somatotropin and chorionmammotropin. In Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 120-123, Vol. 5, Suppl. 2. Ed. National Biomedical Research Foundation, Washington.
- HUBERT, C. & CEDART, L. (1975) Isolation and in vitro translation of human placental lactogen messenger RNA from human term placenta. Nucleic Acid Res. 2, 1903-1910.

- HUMMEL, B.C.W., BROWN, G.M., HWANG, P. & FRIESEN, H.G. (1975) Human and Monkey Prolactin and Growth Hormone : separation of polymorphic forms by isoelectric focusing. *Endocrinology*. 97, 855-867.
- HURLEY, T.W., GRISSOM, F.E., HANDWERGER, S. & FELLOWS, R.E. (1977) Purification and partial characterization of the Cyanogen bromide fragments of Ovine Placental Lactogen. *Biochemistry*. 16, 5605-5609.
- HURLEY, T.W., HANDWERGER, S. & FELLOWS, R.E. (1977) Isolation and structural characterization of Ovine Placental Lactogen. *Biochemistry*. 16, 5598-5604.
- HURLEY, T.W., D'ERCOLE, A.J., HANDWERGER, S., UNDERWOOD, L.E., FURLANETTO, R.W., FELLOWS, R.E. (1977) Ovine Placental Lactogen induces somatomedin : a possible role in fetal growth. *Endocrinology*. 101, 1635-1638.
- HUTTON, J.B. (1957) The effect of growth hormone on the yield and composition of cow's milk. *J. Endocr.* 16, 115-125.
- HWANG, P. GUYDA, H., FRIESEN, H.G. (1971) A radioimmunoassay for Human Prolactin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 68, 1902-1906.
- INGALLS, W.G., CONVEY, E.M., HAFS, H.D. (1973) Bovine serum LH, GH and Prolactin during late pregnancy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 143, 161-164.
- INSKEEP, E.K., SMUTNY, W.J., BUTCHER, R.L., PEXTON, J.E. (1975) Effects of intra-follicular injections of prostaglandins in non-pregnant and pregnant ewes. *J. Anim. Sci.* 41, 1098-1104.
- IKONIKOFF, L.K. de, CEDARD, L. (1976) Localisation immunohistochimique des hormones chorioniques gonadotropes et somatomamotrophiques dans le placenta humain. *Ann. Histochem.* 21, 135-139.
- ITO, Y., HIGASHI, K. (1961) Studies on the Prolactin-like substance in human placenta (II) *Endocrin. Jap.* 8, 279-287.
- JACK, P.M.B. & NATHANIELSZ, P.W., THOMAS, A.L. & STEVEN, D.H. (1975) Ultrastructural changes in the placenta of the ewe following foetal infusion of cortisol. *Quart. J. Exp. Physiol.* 60, 171-179.
- JACOB, F. (1970) *La Logique du Vivant*. Gallimard, Paris.
- JACQUOT, R., LE BARS, H., SIMONNET, H. (1960) *Nutrition animale. Données générales sur la nutrition et l'alimentation*. pp. 515-518, Vol. II, 1. Baillière et Fils, Paris.
- JAFFE, R.B., LEE, P.A. & MIDGLEY, A.R. Jr. (1969) Serum Gonadotropins before, at the inception of, and following human pregnancy. *J. Clin. Endocr. Metab.* 29, 1281-1283.
- JEULIN-BAILLY, C., DELOUIS, C. & DENAMUR, R. (1973) Influence de l'oes-tradiol 17 β et de la progestérone au cours de l'induction par la prolactine et l'hormone de croissance de la différenciation lobuloalvéolaire du tissu mammaire de brebis gestante : étude en culture organotypique. *C.R. Acad. Sci. Paris*. 277, 2525-2528.

JORDAN, R.M., SHAFFHAUSEN, D.D. (1954) Effect of somatotropin on milk yield of ewes. *J. Anim. Sci.* 13, 707-711.

JOSIMOVICH, J.B. (1966) Potentiation of somatotrophic and diabetogenic effects of growth hormone by human placental lactogen (HPL). *Endocrinology* 78, 707-714.

JOSIMOVICH, J.B. (1968) Maintenance of pseudopregnancy in the rat by synergism between human placental lactogen and hCG. *Endocrinology* 83, 530-543.

JOSIMOVICH, J.B. (1976) Human placental lactogen. In *Endocrinology of Pregnancy* (2nd edition). Eds. F. FUCHS, A. KLOPPER, pp. 191-205. Harper & Row Publishers, 2350 Virginia Avenue, Hagerstown, Maryland.

JOSIMOVICH, J.B., ATWOOD, B.L., GOSS, D.A. (1963) The luteotrophic, immunological, and electrophoretic properties of human placental lactogen. *Endocrinology* 73, 410-420.

JOSIMOVICH, J.B., IZENSON, H.A., KOSOR, B., WILSON, L. & WELIKY, I. (1968) Correlation of biological and immunochemical studies on human placental lactogen. In *Growth Hormone*. pp. 129-136. Eds. A. PECILE & E.E. MULLER. Excerpta Medica, Amsterdam.

JOSIMOVICH, J.B., MAC LAREN, J.A. (1962) Presence in the human placenta and term serum of a highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone. *Endocrinology* 71, 209-220.

JOST, A. (1947) Expériences de décapitation de l'embryon de lapin. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 225, 324.

JOST, A. (1951) La physiologie de l'hypophyse foetale. *Biol. Med.* 40, 205-229.

JOST, A. (1977) Le rôle des hormones foetales dans la croissance du fœtus. *J. Physiol. Paris.* 73, 877-890.

JOST, A. (1979) Fetal hormones and fetal growth. In *Gynecology and Obstetric Investigation*. pp. 1-20, Vol. 5. Ed. P.J. KELLER, Karger, Basel.

KALTENBACH, C.C., COOK, B., NISWENDER, G.D., NALBANDOV, A.V. (1967) Effect of pituitary hormones on progesterone synthesis by ovine luteal tissue in vitro. *Endocrinology* 81, 1407-1409.

KANN, G. (1971) Dosage radioimmunologique de la prolactine plasmatique chez les ovins. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 272, 2808-2811.

KANN, G., CARPENTIER, M.C., FEVRE, J., MARTINET, J., MAUBON, M., MEUSNIER, C., PALY, J. & VERMEIRE, N. (1978) Lactation and prolactin in sheep, role of prolactin in initiation of milk secretion. In *Progress in Prolactin Physiology and Pathology*. Eds. C. ROBYN, M. HARTER. Elsevier North-Holland Biomedical Press.

- KANN, G., DENAMUR, R. (1974) Possible role of prolactin during the oestrous cycle and gestation in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 39, 473-483.
- KAPLAN, S.L., GRUMBACH, M.M. (1964) Studies of a human and simian placental hormone with growth hormone-like and prolactin-like activities. *J. Clin. Endocr. and Metabol.* 24, 80-100.
- KAPLAN, S.L., GRUMBACH, M.M., (1965) Immunoassay for human chorionic "growth hormone-prolactin" in serum and urine. *Science*. 147, 751-753.
- KARG, H., SCHAMS, D. & REINHARDT, V. (1972) Effects of 2-Br- α -ergo-cryptin on plasma prolactin level and milk yield in cows. *Experimentia*. 28, 574-576.
- KARSH, F.J., NOVEROSKE, J.W., ROCHE, J.F., NORTON, H.W., NALBANDOV, A. V. (1970) Maintenance of ovine corpora lutea in the absence of ovarian follicles. *Endocrinology*, 87, 1228-1236.
- KEBABIAN, J.W. & CALNE, D.B. (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature*. 277, 93-96.
- KELLY, P.A. (1976) Secretion and biological effects of placental lactogen. In *Endocrinology*. pp. 298-302, Vol. 2. Proc. V Intern. Cong. Endocrinology, Hamburg. Eds. V.H.T. JAMES, Excerpta Medica Foundation.
- KELLY, P.A., LEBLANC, G., DJIANE, J. (1979) Estimation of total prolactin-binding sites after in vitro desaturation. *Endocrinology*. 104, 1631-1638.
- KELLY, P.A., POSNER, B.I., TSUSHIMA, T. & FRIESEN, H.G. (1974) Studies of insulin growth hormone and prolactin binding : ontogenesis, effects of sex and pregnancy. *Endocrinology*. 95, 532-539.
- KELLY, P.A., ROBERTSON, H.A. & FRIESEN, H.G. (1974) Temporal patterns of placental lactogen and progesterone secretion in sheep. *Nature, Lond.* 248, 435-437.
- KELLY, P.A., SHIU, R.P.C., ROBERTSON, M.C. & FRIESEN, H.G. (1973) Placental lactogen levels in several species throughout pregnancy. *Endocrinology*. 92, suppl. Abstract n°370.
- KELLY, P.A., SHIU, R.P.C., ROBERTSON, M.C., FRIESEN, H.G. (1975) Characterization of Rat Chorionic Mammotropin. *Endocrinology*. 96, 1187-1195.
- KELLY, P.A., TSUSHIMA, T., SHIU, R.P.C., FRIESEN, H.G. (1976) Lactogenic and growth hormone-like activities in pregnancy determined by radioreceptor assays. *Endocrinology*. 99, 765-774.
- KITTOK, R.J. & BRITT, J.H. (1977) Corpus luteum function in ewes given estradiol during the estrous cycle or early pregnancy. *J. Anim. Sci.* 45, 336-341.
- KOLIGIAN, K.B. & STORMSHAK, F. (1977) Progesterone inhibition of estrogen receptor replenishment in ovine endometrium. *Biol. Reprod.* 17, 412-416.

- KOSTYO, J.L. (1964) Separation of the effects of growth hormone on muscles amino acid transport and protein synthesis. *Endocrinology*. 75, 113-119.
- KOSTYO, J.L. (1974) The search for the active core of pituitary Growth Hormone. *Metabolism*. 23, 885-899.
- KOSTYO, J.L. (1976) Search for the active site of Growth Hormone. In *Endocrinology. Proc. pp. 186-190, Vol. V. Proc. 5th Congr. Endocr. Hamburg. Brühlsche. Universitäts, drucherei, Giesen*
- KUHN, N.J. (1969 b) Progesterone with drawal as the lactogenic trigger in the rat. *J. Endocrinol.* 44, 39-54.
- KUHN, N.J. (1969 b) Specificity of progesterone inhibition of lactogenesis. *J. Endocr.* 45, 615-616.
- KUMAI, A. (1970) Purification of Human Placental Lactogen. *Endocr. Japon.* 17, 605-610.
- KUMAI, A., NAKANOWATARI, K. & KUROSAWA, Y. (1975) Comparative studies on the two components in Human Chorionic Somatomammotropin. *Agr. Biol. Chem.* 39, 1969-1974.
- KUNZE, H. & VOGT, W. (1971) Significance of phospholipase A for prostaglandin formation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 180, 123-125.
- KUROSAKI, M. (1961) Prolactin-like substance in human placenta. *Tohoku J. Exp. Med.* 57, 122-136.
- LACROIX, M.C., & KANN, G. (1980) Endometrial and embryonic prostaglandins in the early pregnant ewe. In 7 th Seminar on Reproductive Physiology and Sexual Endocrinology, Abstract p.17. Ed. Free University, Brussels.
- LACROIX, M.C., & MARTAL, J. (1979) Mise en évidence et évolution d'une gonadotrophine chorionique chez la Brebis. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 288 (Sér. D), 771-774. _{P27}
- LAURENT, T.C., KILLANDER, J. (1964) A theory of gel filtration and its experimental verification. *J. Chromatogr.* 14, 317-330.
- LAWN, A.M., CHIQUOINE, A.D. & AMOROSO, E.C. (1969) The development of the placenta in the sheep and goat : an electron microscope study. *J. Anatomy*. 105, 557-578.
- LEHNINGER, A.L. (1977) *Biochimie*. Flammarion, Paris.
- LEMON, M. & THIMONNIER, J. (1973) Evolution de la progestérone plasmatique pendant le cycle et la gestation chez les Ruminants. In *Le Corps Jaune*, pp. 51-68. Eds. R. DENAMUR, A. NETTER. Masson, Paris.
- LEMONS, J.A., ADCOCK, E.W., JONES, M.D., NAUGHTON, M.A., MESCHIA, G. & BATTAGLIA, F.C. (1976) Umbilical uptake of aminoacids in the unstressed fetal lamb. *J. Clin. Invest.* 58, 1428-1434.

LEONTIC, E.A., SCHRUEFER, J.J., ANDREASSEN, B., PINTO, H. & TYSON, J.E. (1979) Further evidence for the role of prolactin on human fetoplacental osmoregulation. *Ann. J. Obstet. Gynecol.* 133, 435-438.

LEONTIC, E.A. & TYSON, J.E. (1977) Prolactin and fetal osmoregulation : water transport across isolated human amnion. *Ann. J. Physiol.* 232, R124-R127.

LEWIS, G.S., JENKINS, P.E., FOGWELL, R.L. & INSKEEP, E.K. (1978) Concentrations of prostaglandins E₂ and F₂ α and their relationship to luteal function in early pregnant ewes. *J. Anim. Sci.* 47, 1314-1323.

LEWIS, G.S., WILSON, L., WILKS, J.W., PEXTON, J.E., FOGWELL, R.L., FORD, S.P., BUTCHER, R.L., THAYNE, W.V. & INSKEEP, E.K. (1977) PGF₂ α and its metabolites in uterine and jugular venous plasma and endometrium of ewes during early pregnancy. *J. Anim. Sci.* 45, 320-327.

LEWIS, G.S., WILSON, L.Jr., WILKS, J.W., PEXTON, J.E., INSKEEP, E.K., SMUTNY, W.J., BUTCHER, R.L. & PEXTON, J.E. (1975) Effects of intra-follicular injections of prostaglandins in non-pregnant and pregnant ewes. *J. Anim. Sci.* 41, 1098-1104.

LI, CH. (1972) Recent knowledge of the chemistry of lactogenic hormones. In *Lactogenic Hormones*. pp. 7-26. Eds. G.E.W. WOLSTENHOLME & J. KNIGHT. Churchill, Livingstone, Edinburgh & London.

LI, C.H. (1976) Studies on pituitary lactogenic hormone. The primary structure of the porcine hormone. *Int. J. Peptide Res.* 8, 205-224.

LI, C.H. (1978) Noncovalent interaction of the NH₂-terminal fragment of human somatotropin with the COOH-terminal fragment of human choriomammatropin to generate growth-promoting activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 1700-1702.

LI, C.H., BEWLEY, T.A., BLAKE, J. & HAYASHIDA, T. (1977) Human somatotropin : restoration of full biological activity by noncovalent interaction of a natural and a synthetic fragment of the hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 1016-1019.

LI, C.H., DIXON, J.S. & CHUNG, D. (1971) Primary structure of the Human Chorionic Somatomammotropin (HCS) molecule. *Science.* 173, 56-58.

LI, C.H., DIXON, J.S. & CHUNG, D. (1973) Amino acid sequence of Human Chorionic Somatomammotropin. *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 95-110.

LI, C.H., GRUMBACH, M.M., KAPLAN, S.L., JOSIMOVICH, J.B., FRIESEN, H.G., CATT, K.J. (1968) Human Chorionic Somatomammotropin (HCS) proposed terminology for designation of a placental hormone. *Experimentia.* 24, 1288.

LI, C.H. & PEDERSEN, K.O. (1953) Sedimentation behavior of hypophyseal growth hormone. *J. Biol. Chem.* 201, 595-600.

LIGGINS, G.C. (1979) Initiation of parturition. *Br. Med. Bull.* 35, 145-150.

LIGGINS, G.C., GRIEVES, S.A. (1971) Possible role of prostaglandin F₂ α in parturition in sheep. *Nature, Lond.* 232, 629-631.

- LIGGINS, G.C. & KENNEDY, P.C. (1968) Effects of electrocoagulation of the fetal lamb hypophysis on growth and development. *J. Endocr.* 40, 371-381.
- LORENSON, M.G. & ELLIS, S. (1975) Amino terminal residue heterogeneity of Bovine and Ovine Growth Hormones as revealed by polyacrylamide gel electrophoresis. *Endocrinology*. 96, 833-838.
- LOTEN, E.G., SNEYD, J.G.T. (1970) An effect of insulin on adipose tissue adenosine 3', 5' cyclic monophosphate phosphodiesterase. *Biochem. J.* 120, 187-193.
- LUCK, J.M., MORRISSON, G. & WILBUR, L.F. (1928) Effect of insulin on the aminoacid content of blood. *J. Biol. Chem.* 77, 151-156.
- LYONS, W.R. (1958) Hormonal synergism in mammary growth. *Proc. Roy. Soc.* 149, (Sér. B) 303-325.
- MANNI, A., CHAMBERS, M.J. & PEARSON, O.H. (1978) Prolactin induces its own receptors in rat liver. *Endocrinology*. 103, 2168-2171.
- MANNIS, J.G. & BODA, J.M. (1965) Effects of ovine growth hormone and prolactin on blood glucose, serum insulin, plasma non esterified fatty acids and amino nitrogen in sheep. *Endocrinology*. 76, 1109-1114.
- MARSH, J.M. (1970) The stimulatory effect of Luteinizing Hormone on adenylyl cyclase in the bovine corpus luteum. *J. Biol. Chem.* 245, 1596-1603.
- MARSH, J. (1970) The effect of prostaglandins on the adenylyl cyclase of the bovine corpus luteum. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 180, 416-425.
- MARSH, J. M., BUTCHER, R.W., SAVARD, K., SUTHERLAND, E.W. (1966) The stimulatory effect of Luteinizing Hormone on adenosine 3'5'-Monophosphate accumulation in corpus luteum slices. *J. Biol. Chem.* 241, 5436-5440.
- MARTAL, J. (1967) La prolactine placentaire ou l'hormone de croissance et de lactation du placenta. Thèse de Doctorat Vétérinaire, 146 p. P₁
- MARTAL, J. (1970) Synthèse du lactose par des tranches de glande mammaire de Lapine et de Cobaye. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 10, 209-221. P₂
- MARTAL, J. (1972) Détermination radioimmunologique des hormones de croissance ovine et bovine : étude des conditions d'iodation et obtention d'une hormone somatotrope radioiodée sans prolactine contaminante. *C.R. Acad. Sci. Paris, série D*, 274, 2893-2896. P₃
- MARTAL, J. (1972) Détermination radioimmunologique des hormones de croissance ovine et bovine : Neutralisation ou élimination des anticorps anti-prolactine dans les immunsérums anti-hormone somatotrope. *C.R. Acad. Sci. Paris, série D*, 275, 2379-2382. P₄
- MARTAL, J. (1973) Dosage radioimmunologique des hormones de croissance ovine et bovine : technique et applications. *C.R. Acad. Sci. Paris, série D*, 277, 221-224. P₅
- MARTAL, J. (1975) Effets de la traite sur le taux plasmatique de l'hormone somatotrope chez la Brebis et chez la Chèvre. *C.R. Acad. Sci. Paris, série D*, 280, 197-200. P₆
- MARTAL, J. (1975) Variations du taux plasmatique de l'hormone somatotrope au cours de la journée chez la Chèvre en lactation ou tarie. *C.R. Acad. Sci. Paris, série D*, 2357-2360. P₇

- MARTAL, J. (1978) Placental growth hormone in sheep : purification, properties and variations. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 18, 45-51. ^P_{17x}
- MARTAL, J. (1978) Propriétés immunologiques de la somatomammotrophine chorionique ovine. *C.R. Acad. Sci. Paris, Série D*, 286, 245-248. ^P_{18x}
- MARTAL, J. (1978) L'hormone lactogène placentaire de la Vache. *Journées de la Société Française de Buatrie*, pp. 55-61. Ed. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. ^C₂₂
- MARTAL, J. (1978) La Trophoblastine ou le message embryonnaire de signal de la gestation. *Journées de la Société Française de Buatrie*, pp. 51-53. Ed. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. ^C₂₃
- MARTAL, J. (1979) L'hormone lactogène placentaire de la Vache : son rôle dans le développement de la glande mammaire, dans la croissance foetale et dans la pathogénie de l'acétonémie puerpérale. Dans : *Physiopathologie de l'utérus chez la Vache*. Eds. A. Constantin et Meissonnier (sous presse). ^P₂₅
- MARTAL, J. (1979) Régulation endocrinienne du corps jaune chez la Vache. Existence éventuelle d'une trophoblastine, signal embryonnaire de la gestation. Dans : *Physiopathologie de l'utérus chez la Vache*. Eds. A. Constantin et Meissonnier (sous presse). ^P₂₆
- MARTAL, J. & DJIANE, J. (1975) Purification of a lactogenic hormone in sheep placenta. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 65, 770-778. ^P_{8x}
- MARTAL, J. & DJIANE, J. (1976) Isolement d'une hormone placentaire ovine permettant la lactation et la croissance. *Ile Journée de la Recherche Ovine et Caprine*. INRA-ITOVIC, Paris, pp. 322-329, Ed. ITOVIC-S.P.E.O.C., Paris. ^P₁₃
- MARTAL, J. & DJIANE, J. (1977) Mammothrophic and growth promoting activities of a placental hormone in sheep. *J. Steroid Bioch.* 8, 415-417. ^P_{14x}
- MARTAL, J. & DJIANE, J. (1977) The production of chorionic somatomammotrophin in sheep. *J. Reprod. Fert.* 49, 285-289. ^P_{15x}
- MARTAL, J., DJIANE, J. & DELOUIS, C. (1975) Isolation and characterization of an ovine placental lactogenic hormone. *Proc. int. Symp. on Growth hormone and related peptides*, Milan, Suppl. 1, p. 125, *Ric. Sci. Ed., Educazione Permanente*, Milan. ^P_{9x}
- MARTAL, J., DJIANE, J. & DELOUIS, C. (1976) Purification and lactogenic activity of an ovine placental hormone. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 16, p. 162 (Abstract). ^C₁₁
- MARTAL, J., DJIANE, J. & DUBOIS, M.P. (1977) Immunofluorescent localization of ovine Placental Lactogen. *Cell. Tiss. Res.* 184, 427-433. ^P_{16x}
- MARTAL, J. & LACROIX, M.C. (1978) Production of Chorionic Somatomammotrophin (oCS), Fetal growth and Growth of the placenta and the corpus luteum in ewes treated with 2-bromo- α -ergocryptine. *Endocrinology*, 103, 193-199. ^P_{19x}
- MARTAL, J. & LACROIX, M.C. (1978) Importance d'une trophoblastine dans le contrôle endocrinien du corps jaune gestatif chez la Brebis au moment de l'implantation. Dans : *Implantation de l'oeuf*, pp. 193-208. Eds. F. du Mesnil du Buisson, A. Psychoyos et K. Thomas, Masson, Paris. ^P_{21x}
- MARTAL, J., LACROIX, M.C., LOUDES, C., SAUNIER, M. & WINTENBERGER-TORRES, S. (1979) Trophoblastin, an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep. *J. Reprod. Fert.* 56, 63-73. ^P_{24x}

- MARTIN, J.M. & FRIESEN, H.G. (1969) Effect of Human Placental Lactogen on the isolated islets of Langerhans in vitro. *Endocrinology*. 84, 619-621.
- MARTIN, J.M. & GAGLIARDINO, J.J. (1967) Effect of growth hormone on the isolated pancreatic islets of rat in vitro. *Nature, Lond.* 213, 630-631.
- MASON, N.R., SCHAFFER, R.J., TOOMEY, R.E. (1973) Stimulation of cyclic AMP accumulation in rats ovaries in vitro. *Endocrinology*. 93, 34-41.
- MATTIES, D.L. (1967) Studies of the luteotrophic and mammatropic factor found in trophoblast and maternal peripheral blood of the rat at midpregnancy. *Anat. Rec.* 159, 55-61.
- MATTIES, D.L. (1968) A rapid assay for the lactogenic activity of rat chorionic mammatropin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127, 1126-1129.
- MAYER, G., ACKER, G., DULUC, A.J. (1973) Endocrinologie comparée de l'activité lutéale. In *Le Corps Jaune*. pp. 257-288. Masson, Paris.
- Mc CONAGHEY, P.E. & SLEDGE, C.B. (1970) Production of sulphation factor by the perfused liver. *Nature, Lond.* 225, 1249-1250.
- Mc CRACKEN, J.A. (1980) Hormone receptor control of prostaglandin $F_2\alpha$ secretion by the ovine uterus. In *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*. pp. 1329-1344, Vol. 8. Eds. B. Samuelson, P.W. Ramwell & R. PAOLETTI. Raven Press, New-York.
- Mc CRACKEN, J.A., BARCIKOWSKI, B., CARLSON, J.C., GREEN, K. & SAMUELSSON, B. (1972 b) The physiological role of $PGF_{2\alpha}$ in corpus luteum regression. *Adv. Biosci.* 9, 599-624.
- Mc CRACKEN, J.A., CARLSON, J.C., GLEW, M.E., GODING, J.R., BAIRD, D.T., GREEN, K. & SAMUELSON, B. (1972 a) Prostaglandin $F_2\alpha$ identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nature, Lond.* 238, 129-134.
- Mc CRACKEN, J.A. & SCHRAMM, W. (1980) Evidence for an antiluteolytic effect of the ovine blastocyst. In *7th Intern. Seminar on Reproductive Physiol. and Sexual endocrinology*, Brussels. Ed. Free University, Brussels.
- Mc GARRY, E.E. & BECK, J.C. (1972) Biological effects of non-primate prolactin and human placental lactogen. In *Lactogenic Hormones*. pp. 361-389. Eds. G.E. WOLSTENHOLME & J. KNIGHT. Ed. Churchill, Livingstone, Edinburgh, London.
- MEITES, J. (1961) Farm animals : hormonal induction of lactation and galactopoiesis. In *Milk : the Mammary Gland and its Secretion*. pp. 321-367, Vol. 11. Eds. S. KON & A.T. COWIE. Acad. Press, New-York.
- MEITES, J. (1979) Control of prolactin release. In *Proc. Intern. Symp. Growth Hormone and other biologically active Peptides*. Eds. A. PECILE, E.E. MULLER. p. 34, Suppl. 11. *Ricerca Scientifica*, Ed. Educazione Permanente.
- MELBY, J.C., DALE, S.L., WILSON, T.E., NICHOLS, A.S. (1966). Stimulation of aldosterone secretion by Human Placental Lactogen. *Clin. Res.* 14, 283.
- MENON, K.M.J. (1973) Purification and properties of a protein kinase from bovine corpus luteum that is stimulated by cyclic AMP and Luteinizing Hormone. *J. Biol. Chem.* 248, 494-501.

- MIDGLEY, A.R. & PIERCE, G.B. (1962) The immunohistochemical localization of human chorionic gonadotropin. *J. Exp. Med.* 115, 289-294.
- MIDGLEY, A.R., PIERCE, G.B., DENEAU, G.A., GOSLING, J.R.G. Morphogenesis of syncytiotrophoblast in vivo : an autoradiographic demonstration. *Science*. 141, 349-350.
- MINTZ, D.H., CHEZ, R.A. & HUTCHINSON, D.L. (1972) Sub-human primate pregnancy complicated by streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 51, 837-847.
- MOOR, R.M. (1968) Effect of embryo on corpus luteum function. *J. Anim. Sci.* 27, 97-116.
- MOOR, R.M. & ROWSON, L.E.A. (1966 a) The corpus luteum of the sheep : functional relationship between the embryo and corpus luteum. *J. Endocr.* 34, 223-239.
- MOOR, R.M. & ROWSON, L.E.A. (1966 b) local maintenance of the corpus luteum in sheep with embryos transferred to various isolated portions of the uterus. *J. Reprod. Fert.* 12, 539-550.
- MOOR, R.M. & ROWSON, L.E.A. (1966 c) The corpus luteum of the sheep : effects of removal of the embryos on luteal function. *J. Endocr.* 34, 497-502.
- MOOR, R.M., ROWSON, L.E.A., HAY, M.F., CALDWELL, B.V. (1969) The corpus luteum of the sheep : effect of the conceptus on luteal function at several stages during pregnancy. *J. Endocr.* 43, 301-307.
- MOORE, N.W., ROWSON, L.E.A. (1959) Maintenance of pregnancy in ovariectomized ewes by means of progesterone. *Nature, Lond.* 184, 1410.
- MORETTI, J. (1967) Catabolisme des protéines marquées par ¹³¹I. Etude critique des méthodes de calcul. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 49, 99-113.
- MURPHY, G., ARIYANAYAGAM, A. & KUHN, N.J. (1973) Progesterone and the metabolic control of the lactose biosynthetic pathway during lactogenesis in the rat. *Biochem. J.* 136, 1105-1116.
- NAEYE, R.L. (1965) Infants of diabetic mothers : a quantitative morphology study. *Pediatrics, Springfield.* 35, 980-988.
- NAGASAWA, H. & YANAI, R. (1971) Quantitative participation of placental mammatropic hormones in mammary development during pregnancy of mice. *Endocrinol. Jap.* 18, 507-510.
- NEILL, J.D., JOHANSSON, E.D.B., KNOBIL, E. (1969) Failure of hysterectomy to influence the normal pattern of cyclic progesterone secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology.* 84, 464-465.
- NEILL, J.D. & KNOBIL, E. (1972) On the nature of the initial luteotropic stimulus of pregnancy in the rhesus monkey. *Endocrinology.* 90, 34-38.
- NERI, P., AREZZINI, C., CANALI, G., COCOLA, F. & TARLI, P. (1972) In *Growth & Growth Hormone*. pp. 199-208. Eds. A. PECILE & E.E. MULLER. Excerpta Med. Foundation. Amsterdam.
- NETT, T.M., STAIGMILLER, R.B., AKBAR, A.M., DIEKMAN, M.A., ELLINWOOD, W. E. & NISWENDER, G.D. (1976) Secretion of prostaglandin F₂ α in cycling and pregnant ewes. *J. Anim. Sci.* 42, 876-880.
- NEWTON, M. (1961) Human Lactation. In *Milk*. pp. 281-320, Vol. 1. Eds. S. K. KON & A.T. COWIE. Acad. Press, New-York.

- NEWTON, W.H., LITS, F.J. (1938) Criteria of placental endocrine activity in the mouse. *Anat. Rec.* 72, 333-350.
- NIALL, H.D. (1971) Revised primary structure for Human Growth Hormone. *Nature, Lond. New. Biol.* 230, 90-91.
- NIALL, H.D., HOGAN, M.L., SAUER, R., ROSENBLUM, I.Y., GREENWOOD, F.C. (1971) Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones : evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68, 866-869.
- NIALL, H.D., HOGAN, M.L., TREGGAR, G.W., SEGRE, G.V., HWANG, P., FRIESEN, H. (1973) The chemistry of growth hormone and the lactogenic hormones. *Rec. Prog. Horm. Res.* 29, 387-416.
- NICOLL, C.S., BERN, A.H. (1968) Further analysis of the occurrence of pigeon cropsac stimulating activity (prolactin) in the vertebrate adenohypophysis. *Gen. Comp. Endocrinology.* 11, 5-20.
- NICOLL, C.S. & BERN, H.A. (1972) On the actions of prolactin among the vertebrates : is there a common denominator ? In *Lactogenic Hormones*. Eds. G.E. WOLSTENHOLME & J. KNIGHT. Ed. Churchill, Livingstone, Lond.
- NICOLL, C.S., BERN, H.A. & BROWN, D. (1966) Occurrence of mammatrophic activity (prolactin) in the vertebrate adenohypophysis. *J. Endocr.* 34, 343-354.
- NISWENDER, G.D., MENON, K.M.J. & JAFFE, R.B. (1972) Regulation of the corpus luteum during the menstrual cycle and early pregnancy. *Fert. Steril.* 23, 432-442.
- NISWENDER, G.D., REIMERS, T.J., DIEKMAN, M.A. & NETT, T.M. (1976) Blood flow a mediator of ovarian function. *Biol. Reprod.* 14, 64-81.
- NIXON, W.E., HODGEN, G.D., NIEMAN, W.H., ROSS, G.T., TULLNER, W.W. (1972) Urinary chorionic gonadotropin in middle and late pregnancy in the chimpanzee. *Endocrinology.* 90, 1105-1109.
- NOVY, M.J., COOK, M.J. (1973) Redistribution of blood flow by prostaglandin F_{2α} in the rabbit ovary. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 113, 381-385.
- NUTTING, D.F., KOSTYO, J.L., GOODMAN, H.M., FELLOWS, R.E. (1970) Biologically active cyanogen bromide fragments of bovine growth hormone. *Endocrinology.* 86, 416-419.
- NUTTING, D.F., KOSTYO, J.L., MILLS, J.B. & WILHELMI, A.E. (1972) Dissociation of some of the biological activities of porcine and human growth hormones by cyanogen bromide cleavage. *Endocrinology.* 90, 1202-1213.
- OREVI, M., GORIN, E. & SHAFRIF, E. (1972) Adaptive changes of phosphofructokinase and aldolase in adipose tissue. *Eur. J. Biochem.* 30, 418-426.
- ORNSTEIN, L. (1964) Disc electrophoresis I. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 321-403.
- ORTAVANT, R. (1977) Photoperiodic regulation of reproduction in the sheep. In *Management of Reproduction in Sheep and Goats*, pp. 58-71. Ed. C.E. TERRILL. University of Wisconsin, Madison, Wisconsin.
- OXENDER, W.D., HAFS, H.D. & EDGERTON, L.A. (1972) Serum growth hormone, LH and prolactin in the pregnant cow. *J. Anim. Sci.* 35, 51-55.

- OWEN, E.C. & DARROCH, R.A. (1957) The effect of thyrotropin on milk yield and heart rate of the goat. *J. Dairy Res.* 24, 157-161.
- PAAPE, M.J., GUIDRY, A.J. & APRIL, M. (1973) Preliminary observation following hormonally induced lactation. *J. Dairy Sci.* 56, 657.
- PALMITER, R.D. (1973) Ovalbumin messenger Ribonucleic Acid translation. *J. Biol. Chem.* 248, 2095-2106.
- PALMITER, R.D. (1974) Magnesium precipitation of Ribonucleo-protein complexes. Expedient techniques for the isolation of undegraded polysomes and Messenger Ribonucleic Acid. *Biochemistry*, 13, 3606-3615.
- PALMITER, R.D., PALACIOS, R. & SCHIMKE, R.T. (1972) Identification and isolation of ovalbumin synthesizing polysomes. II. Quantification and immunoprecipitation of polysomes. *J. Biol. Chem.* 247, 3296-3304.
- PAPKOFF, H., LI, C.H. (1962) Hypophyseal Growth Hormone. In *Methods in Hormone Research*. pp. 671-704, Vol. II. Ed. R.I. DORFMAN. Acad. Press, New-York and London.
- PEETERS, S. & FRIESEN, H.G. (1977) A Growth Hormone binding factor in the serum of pregnant mice. *Endocrinology*. 101, 1164-1179.
- PENCHARZ, R.I. & LONG, J.A. (1933) Hypophysectomy in the pregnant rat. *Am. J. Anat.* 53, 117-139.
- PETERSON, A.J., TERVIT, H.R., FAIRCLOUGH, R.J., HAVIK, P.G. & SMITH, J.F. (1976) Jugular levels of 13,14-dihydro-15-Keto-prostaglandin F and progesterone around luteolysis and early pregnancy in the ewe. *Prostaglandins*. 12, 551-558.
- PHELPS, R.A. & PUTNAM, F.W. (1960) In the Plasma Proteins. p. 143, Vol. I. Ed. F.W. PUTNAM. Acad. Press, New-York.
- PHILIPS, L.S., HERINGTON, A.C. & DAUGHADAY, W.H. (1975) Steroid hormones effects on somatomedin. I. Somatomedin action in vitro. *Endocrinology*. 97, 780-786.
- PIPER, P.J., VANE, J.R. & WYLLIE, J.H. (1970) Inactivation of prostaglandins by the lungs. *Nature*, 225, 600-604.
- POSNER, B.I., GUYDA, H.J. & OMORI, Y. (1977) Insulin, insulin-like activity and the human placenta. *J. Steroid Biochem.* 8, 387-393.
- POSNER, B.I., KELLY, P.A. & FRIESEN, H.G. (1975) Prolactin receptors in rat liver : possible induction by prolactin. *Science*. 188, 57-59.
- POSNER, B.I., KELLY, P.A., SHIU, R.P.C. & FRIESEN, H.G. (1974) Studies on insulin, growth hormone and prolactin binding : tissue distribution, species variation and characterization. *Endocrinology*. 95, 521-531.
- POPE, W.F. & STORMSHAK, F. (1979) Effect of the ovine conceptus on in vitro responses of uterine arteries to prostaglandin E2 and Norepinephrine. *Biol. Reprod.* 20, 847-851.
- POWELL, W.S., HAMMARSTROM, S., SAMUELSSON, B. (1974) Prostaglandin F_{2α} receptor in ovine corpora lutea. *Eur. J. Biochem.* 41, 103-107.

- PRATT, B.R., BUTCHER, R.L. & INSKEEP, E.K. (1977) Antiluteolytic effect of the conceptus and of PGF₂ α in ewes. *J. Anim. Sci.* 45, 784-791.
- PRUNET, P., DJIANE, J. & BRETON, B. (1977) Application of a radioreceptor assay for lactogenic activity to the detection of fish prolactin-like hormone. *J. Endocr.* 73, 391-392.
- PRUNET, P., HOUDEBINE, L.M., DELOUIS, C., BRETON, B. (1979) Stimulation of milk synthesis in the rabbit by fish pituitary extract. *J. Endocr.* 83, 393-400.
- PTASHNE, K., HSUEH, H.W. & STOCKDALE, F.E. (1979) Partial purification and characterization of Mammary Stimulating Factor, a protein which promotes proliferation of mammary epithelium. *Biochemistry*. 18, 3533-3539.
- RATTRAY, P.V., GARRETT, W.N., EAST, N.E. & HINMAN, N. (1974) Growth development and composition of the ovine conceptus and mammary gland during pregnancy. *J. Anim. Sci.* 38, 613-629.
- RAMWELL, P.W., LEOVEY, E.M.K. & SINTETOS, A.L. (1977) Regulation of the Arachidonic Acid cascade. *Biol. Reprod.* 16, 70-87.
- RANKIN, J.H.G. & PHERNETTON, T.M. (1976) Effect of prostaglandin E2 on ovine maternal placental blood flow. *Am. J. Physiol.* 231, 754-759.
- RAO, C.V. (1974) Differences between in vivo and in vitro actions of prostaglandins in corpus luteum is there a paradox ? *Prostaglandins*. 7, 209-213.
- RAO, C.V. (1974) Properties of gonadotropin receptors in the cell membranes of bovine corpus luteum. *J. Biol. Chem.* 249, 2864-2872.
- RAPPAPORT, R. & CORVOL, M.T. (1978) Cartilage de croissance dans ses aspects métaboliques et la régulation hormonale de son développement. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18, 21-27.
- RATHNAM, P., CEDERQVIST, L. & SAXENA, B.B. (1977) Isolation of prolactin from human amniotic fluid. *Bioch. Biophys. Acta.* 492, 186-193.
- RAY, E.W., AVERILL, S.C., LYONS, W.M.R., JOHNSON, R.E. (1955) Rat placental hormonal activities corresponding to those of pituitary mammotropin. *Endocrinology*. 56, 359-373.
- REAGAN, C.R., MILLS, J.B., KOSTYO, J.L. & WILHELMI, A.E. (1975) Isolation and biological characterization of fragments of human growth hormone produced by digestion with plasmin. *Endocrinology*. 96, 625-636.
- REDDY, S. & WATKINS, W.B. (1978) Immunofluorescence localization of ovine placental lactogen. *J. Reprod. Fert.* 52, 173-174.
- REMESY, C. & DEMIGNE, C. (1979) Effects of undernutrition during late pregnancy on gluconeogenesis and ketogenesis in turn-pregnant ewes. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 19, 241-250.
- REYNOLDS, M. (1972) Disorders of lactation and the mammary gland. In *Pathophysiology of gestation*. Ed. N.S. ASSALI. pp. 536-539, Vol. 1. Acad. Press. N.Y., Lond.

- RICHARDS, J.S., WILLIAMS, J. (1976) Luteal cell receptor content for prolactin (PRL) and Luteinizing Hormone (LH) : regulation by LH and PRL. *Endocrinology*. 99, 1571-1581.
- RICORDEAU, G., BOCCARD, R. & DENAMUR, R. (1960) Mesure de la production laitière des brebis pendant la période d'allaitement. *Ann. Zootech.* 9, 97-120.
- RIDDICK, D.H. & KUSMIK, W.F. (1977) Decidua : a possible source of amniotic fluid prolactin. *Ann. J. Obstet. Gynecol.* 127, 187-190.
- ROBERTS, E.M. (1966) The use of intravaginal sponges impregnated with 6-methyl-17-acetoxy-progesterone (MAP) to synchronize ovarian activity in cyclic Merino ewes. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 6, 32-37.
- ROBERTSON, M.C. & FRIESEN, H.G. (1975) The purification and characterization of Rat Placental Lactogen. *Endocrinology*. 97, 621-629.
- ROBINSON, T.J. (1965) Use of progestagen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for the control of the oestrous cycle in the sheep. *Nature, Lond.* 206, 39-41.
- ROGOL, A.D. & ROSEN, S.W. (1974) Prolactin of apparent large molecular size : the major immunoactive prolactin component in plasma of a patient with a pituitary tumor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38, 714-717.
- ROLSCHAU, J., DATE, J., KRISTOFFERSEN, K., PEDERSEN, G.T. & ULRICH, M. (1975) Correlation between human chorionic sommatomammotrophin and placental weight. *Acta obstet. Gynaec. Scand.* 54, 341-346.
- ROMBAUTS, P. (1959 a) L'anabolisme de gestation chez la Brebis. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 248, 1859-1861.
- ROMBAUTS, P. (1959 b) Etude de l'anabolisme de gestation par l'analyse corporelle des mères. *C.R. Soc. Biol.* 153, 556-558.
- ROMBAUTS, P. (1959 c) Anabolisme de gestation et lactation. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 248, 2410-2412.
- ROMBAUTS, P., BOURDEL, G. & JACQUOT, R. (1956) Analyse de l'anabolisme gravidique chez le Rat blanc en vue de la définition des besoins nutritionnels de la gestation. *Arch. Sc. Physiol.* 10, 173-193.
- ROUS, S. (1977 a) Régulation de l'activité des enzymes de la lipolyse et de la lipogénèse dans le tissu adipeux. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 17, 807-825.
- ROUS, S. (1977 b) Fasting and insulin regulation of the utilization of aceto-acetate for fatty acid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 179, 328-333.
- ROWSON, L.E.A. & MOOR, R.M. (1967) The influence of embryonic tissue homogenate infused into the uterus on life-span of the corpus luteum in the sheep. *J. Reprod. Fert.* 13, 511-516.

RUSSELL, A.J.F., DONEY, J.M. & REID, R.L. (1967) The use of biochemical parameters in controlling nutritional state in pregnant ewes and the effect of undernourishment during pregnancy on lamb birth-weight. *J. Agric. Sci. Camb.* 68, 351-358.

SAITO, T., SAXENA, B.B. (1975) Specific receptors for prolactin in the ovary. *Acta Endocrinol.* 80, 126-137.

SALMON, W.D. (1972) Investigation with a partially purified preparation of serum sulfation factor : lack of specificity for cartilage sulfation. In *Growth Hormone*, Milan. pp. 180-191. Eds. A. PECILE & E.E. MULLER, Excerpta Medica, Amsterdam.

SASSER, R.G., NISWENDER, G.D., NETT, T.M. (1977) Prostaglandins. 13, 1201-1208.

SAVARD, K., MARSH, J.M., RICE, B.F. (1965) Gonadotropins and ovarian steroidogenesis. *Rec. Prog. Horm. Res.* 21, 285-365.

SAXENA, B.N., EMERSON, K. & SLENKOW, H.A. (1969) Serum Placental Lactogen (HPL) levels as an index of placental function. *New Engl. J. Med.* 281, 225-231.

SEPPALA, M. & RUOSLAHTI, E. (1970) Serum concentration of Human Placental Lactogenic Hormone (HPL) in pregnancy complications. *Acta obstet. Gynaec. Scand.* 49, 143-147.

SCHALLY, A.V., COY, D.H. & MEYERS, C.A. (1978) Hypothalamic regulatory hormones. *Ann. Rev. Biochem.* 47, 89-128.

SCHIMPF, R.M., DONNADIEU, M., GLASINOVIC, J.C., WARNET, J.M. & GIRARD, F. (1976) The liver as a source of somatomedin. *Acta Endocrinologica.* 83, 365-372.

SCHALCH, D.S. & REICHLIN, S. (1966) Plasma Growth Hormone concentration in the rat determined by radioimmunoassay : influence of sex, pregnancy, lactation, anesthesia, hypophysectomy and extracellular pituitary transplants. *Endocrinology.* 79, 275-280.

SCHANENBERG, P. (1976) Les animaux du passé. In *le Grand Livre de la Vie Animale*. pp. 1-42, Vol. I. Ed. P. SCHAUNENBERG. Editio Service, S.A., Genève.

SCHMIDT, G. & THANNHAUSER, S.J. (1945) A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.* 161, 83-89.

SCHEINEIDER, A.B., KOWALSKI, K., BUCKMAN, G. & SHERWOOD, L.M. (1977) Dimeric ("Big") human Placental Lactogen immunological and biological activity. *Bioch. Biophys. Acta.* 493, 69-77.

SCHNEIDER, A.B., KOWALSKI, K. & SHERWOOD, L.M. (1975 a) Identification of "Big" Human Placental Lactogen in placenta and serum. *Endocrinology.* 97, 1364-1372.

SCHNEIDER, A.B., KOWALSKI, K. & SHERWOOD, L.M. (1975 b) "Big" Human Placental Lactogen : disulfide-linked peptide chains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 717-724.

SCIARRA, J.J., KAPLAN, S.L., GRUMBACH, M.M. (1963) Localization of anti-human growth hormone serum within the human placenta : evidence for a human chorionic "growth hormone-prolactin". *Nature, Lond.* 4897, 1005-1006.

SCIARRA, J., SHERWOOD, L.M., VARNA, A.A. & LUNDBERG, W.B. (1968) Human Placental Lactogen (HPL) and placental weight. *Am. J. Obstet. Gynaec.* 101, 413-416.

SHANI, M.J., ZANBELMAN, L., KHAZEN, K. & SULMAN, F.G. (1970) Mammotropic and prolactin-like effects of rat and human placenta and amniotic fluid. *J. Endocr.* 46, 15-20.

SHELLEY, H.J. (1975) Insulin and the control of plasma glucose concentration in chronically catheterized foetal lambs. *J. Physiol. Lond.* 251, 71 p.

SHELTON, J.N. (1965) Identification of progesterone of high activity for the control of the oestrous cycle in the sheep. *Nature, Lond.* 206, 156-158.

SHERWOOD, L.M. (1967) Similarities in the chemical structure of human placental lactogen and pituitary growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 58, 2307-2314.

SHERWOOD, L.M., HANDWERGER, S., Mc LAURIN, W.D. & LANNER, M. (1971) Amino-acid sequence of human placental lactogen. *Nature, Lond. New Biol.* 233, 59-61.

SHIU, R.P.C., KELLY, P.A. & FRIESEN, H.G. (1973) Radioreceptor assay for prolactin and other lactogenic hormones. *Science.* 180, 968-970.

SHIU, R.P.C., FRIESEN, H.G. (1974 a) Solubilization and purification of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland. *J. Biol. Chem.* 249, 7902-7911.

SHIU, R.P.C. & FRIESEN, H.G. (1974 b) Properties of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland. *Biochem. J.* 140, 301-311.

SHIU, R.P.C., FRIESEN, H.G. (1976) Blockade of prolactin action by an antiserum to its receptors. *Science.* 192, 259-261.

SHOME, B. & FRIESEN, H.G. (1971) Purification and characterization of Monkey Placental Lactogen. *Endocrinology.* 89, 631-641.

SHOME, B. & PARLOW, A.F. (1977) Human pituitary prolactin (hPRL) : the entire linear aminoacid sequence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45, 1112-1115.

SHORT, R.V., MOORE, N.W. (1959) Progesterone in blood. V. Progesterone and 20α -hydroxy pregn-4-en-3-one in the placenta and blood of ewes. *J. Endocr.* 19, 288-293.

SHUSTER, R.T., HOUBEINE, L.M. & GAYE, P. (1976) Studies on the synthesis of casein messenger RNA during pregnancy in the rabbit. *Eur. J. Biochem.* 71, 193-199.

SIEGEL, L.M. & MONTY, K.J. (1964) Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparation of sulfite and hydroxylamide reductases. *Biochem. Biophys. Acta.* 112, 346-362.

SILER-KHODR, T.M., KHODR, G.S. (1978) Content of luteinizing hormone releasing factor in the human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130, 216-219.

SILVER, M., STEVEN, D.H. & COMLINE, R.S. (1973) Placental exchange and morphology in ruminants and mare. In *Foetal and Neonatal Physiology*. pp. 245-271. Barcroft Centenary Symposium. Eds. R.S. COMLINE, K.W. CROSS, G.S. DAWES, P.W. NATHANIELSZ. Cambridge Univ. Press.

SINGER, W., DESJARDINS, P. & FRIESEN, H.G. (1970) Human Placental Lactogen. An index of placental function. *Acta. Obstet. Gynec. N.Y.* 36, 222-232.

SINGH, R.N.P., STEAVEY, B.K., RICE, V.P. (1974) Modified forms of Human Growth Hormone with increased biological activities. *Endocrinology* 94, 883-891.

SMITH, P.E. (1954) Continuation of pregnancy in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following hypophysectomy. *Endocrinology*. 55, 655-664.

SMITH, K.L. & SCHANBACHER, F.L. (1973) Hormone induced lactation in the bovine. I. Lactational performance following injections of 17 α -estradiol and progesterone. *J. Dairy Sci.* 56, 738-743.

STACY, B.D., WALLACE, (1973) Degradation of GH in vitro by renal lysosomes fraction. *Animal Production*, p. 43 (abstract) CSIRO, Sydney, Australia.

STACY, B.D., WALLACE, A.L.C., GEMELL, R.T. & WILSON, B.W. (1976) Adsorption of ^{125}I -labelled sheep growth hormone in single proximal tubules of the rat kidney.

STEPANOVA, N.A. (1973) Isolation and purification of human placental lactogenic hormone (Russe) *Vest. Lenin. Univ. Ser. : Biol.* 129-130.

STEVEN, D.H. (1973) Placental separation in the ewe. *J. of Physiology* . 233, 10P-12P.

STEVEN, D.H., BASS, F., JANSEN, C.J.M., KRANE, E.J., MALLOW, K., SAMUEL, C.A., THOMAS A.L., NATHANIELSZ, P.W. (1978) Ultrastructural changes in the placenta of the ewe after fetal pituitary stalk section. *Quart. J. Exp. Physiol.* 63, 221-229.

STOKES, H. & BODA, J.M. (1968) Immunofluorescent localization of growth hormone and prolactin in the adenohypophysis of fetal sheep. *Endocrinology*. 83, 1362-1366.

STRONG, C.G. & BOHR, D.F. (1967) Effects of prostaglandins E1, E2, A1 and F1 α on isolated vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 213, 725-733.

SUH, H.K. & FRANTZ, A.G. (1974) Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39, 928-935.

SUSBIELLE, H., GAUDIN-HARDING, F. & JACQUOT, R. (1969) Influence de l'état grévise sur l'utilisation de l'azote et du soufre alimentaires. *Arch. Sci. Physiol.* 23, 135-150.

SUWA, S. & FRIESEN, H. (1969) Biosynthesis of human placental proteins and human Placental Lactogen (hPL) in vitro. I. Identification of ³H-labeled hPL. *Endocrinology*. 85, 1028-1036.

SUWA, S. & FRIESEN, H. (1969) Biosynthesis of human placental proteins and human Placental Lactogen (hPL) in vitro. II. Dynamic studies of normal term placentas. *Endocrinology*. 85, 1037-1045.

SWISLOCKI, N.I., SONENBERG, M., YAMASAKI, N. (1970) In vitro metabolic effects of bovine growth hormone fragments in adipose tissue. *Endocrinology*. 87, 900-904.

SZEGO, C.M. (1974) The lysosome as a mediator of hormone action. *Recent. Prog. Horm. Res.* 30, 171-233.

TALAMANTES, F. (1975) In vitro demonstration of lactogenic activity in the Mammalian placenta. *Amer. Zool.* 15, 279-284.

TALAMANTES, F. (1975) Comparative study of the occurrence of placental prolactin among Mammals. *Gen. Comp. Endocrinology*. 27, 115-121.

TAYLOR, A.L., LIPMAN, R.L., SALAM, A., MINTZ, D.H. (1972) Hepatic Clearance of Human Growth Hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34 395-399.

TESSLER, R.H. & SALMON, W.D. (1975) Glucocorticoid inhibition of sulfate incorporation by cartilage of normal rats. *Endocrinology*. 96, 898-902.

THIMONIER, J., BOSC, M., DJIANE, J., MARTAL, J. & TERQUI, M. (1978) Hormonal diagnosis of pregnancy and number of fetuses in sheep and goats. In *Management of reproduction in sheep and goats*, pp. 79-88. Ed. C. Terrill, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin. P20

THIMONIER, J. & COGNIE, Y. (1977) Application of control of reproduction of sheep. In *Management of Reproduction in Sheep and Goats*, pp. 109-118. Ed. C.E. Terril. University of Wisconsin, Madison, Wisconsin.

THOMSON, R.G. RODRIGUEZ, A., KOWARSKI, A. & BLIZZARD, R.M. (1972) Growth Hormone : Metabolic Clearance Rate, integrated concentrations and production. *J. Clin. Invest.* 51, 3193-3199.

THORNBURN, G.C. (1974) The role of the thyroid gland and kidneys in fetal growth. In *Size at Birth*. pp. 185-200. Ciba Found. Symp. n° 27, Elsevier, Excerpta Medica, Amsterdam.

- THORNBURN, G.D., COX, R.I., CURRIE, W.B., RESTALL, B.J. & SCHNEIDER, W. (1973) Prostaglandins and Progesterone concentrations in the uteroovarian venous plasma of the ewe during the oestrous cycle and early pregnancy. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 18, 151-158.
- TRENKLE, A. (1971) Growth hormone secretion rates in cattle. *J. Anim. Sci.* 32 115-118.
- TSOULOS, N.G., COLWELL, J.R., BATTAGLIA, F., MAKOWSKI, E.L. & MESCHIA, G. (1971) Comparison of glucose, fructose and oxygen uptakes by fetuses of fed and starved ewes. *Am. J. Physiol.* 221, 234-237.
- TSUSHIMA, T. & FRIESEN, H.G. (1973) Radioreceptor assay for growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37, 334-336.
- TULSKY, A.S. & KOFF, A.K. (1957) Some observations on the role of the corpus luteum in early human pregnancy. *Fertil. Steril.* 8, 118-130.
- TURKINGTON, R.W. & TOPPER, Y.J. (1966) Stimulation of casein synthesis and histological development of mammary gland by human Placental Lactogen in vitro. *Endocrinology.* 79, 175-181.
- TURNER, C.D. (1963) *General Endocrinology*, 4th edition. Ed. Saunders Company, Philadelphia, London. pp. 129-138.
- TURNER, C.W., YAMAMOTO, H. & RUPPERT, H.L. (1956) The experimental induction of growth of the cow udder and the initiation of milk secretion. *J. Dairy Sci.* 39, 1717-1729.
- TURTLE, J.R., BECK, P., DAUGHADAY, W.H. (1966) Purification of Human Placental Lactogen. *Endocrinology.* 79, 187-190.
- TYSON, J.E., HWANG, P., GUYDA, H. & FRIESEN, H.G. (1972) Studies of prolactin secretion in human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynec.* 113, 14-20.
- UNDERWOOD, L.E., D'ERCOLE, A.J., FURLANETTO, R.W., HANDWERGER, S. & HURLEY, T.W. (1978) Somatomedin and growth : a possible role for somatomedin in fetal growth. *Int. Symp. Somatomedins and Growth. Santa Margherita Ligure, Italy.* n°50 (abstract)
- USATENKO, M.S. (1970) Hormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in liver and kidney of adult animals and formation of this enzyme in developing rabbit liver. *Biochem. Med.* 3, 298-310.
- UTHNE, K. (1973) Human somatomedins : purification and some studies on their biological actions. *Acta Endocr. Copenh.* pp. 1-35, Suppl. 175.
- UTHNE, K. & UTHNE, T. (1972) Influence of liver resection and regeneration on somatomedin. *Acta Endocrinologica (Copenh.)* 71, 255-264.
- VAN DER BRANDE, J.L. & VAN BUUL, S. (1978) The nature of somatomedins and related peptides. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18, 11-19.
- VAN DER GUGTEN, A.A., WATERS, M.J., MURTHY, G.S. & FRIESEN, H.G. (1980) Studies on the irreversible nature of prolactin binding to receptors. *Endocrinology.* 106, 402-411.
- VAN WYK, J.J., UNDERWOOD, L.E., HINTS, R.L., CLEMMONS, D.R., VOINA, S.J. & WEAVER, R.P. (1974) The somatomedins : a family of insulin-like hormones under growth hormone control. *Rec. Prog. Horm. Res.* 30, 259-318.

- VASSALI, J.D., HAMILTON, J. & REICH, E. (1977) Macrophage Plasminogen Activator : induction by Concanavalin A and Phorbol Myristate Acetate. *Cell*, 11, 695-705.
- VERNON, R.G. & WALKER, D.G. (1968) Changes in activity of some enzymes involved in glucose utilization and formation in developing rat liver. *Biochem. J.* 106, 321-329.
- VESIN, M.F., DOG HAC, L. & HARBON, S. (1979) Prostacyclin as an endogenous modulator of Adenosine Cyclic 3'5'-Monophosphate levels in Rat myometrium and endometrium. *Molecular Pharmacology*, 16, 823-840.
- VEZINHET, A. (1968) Effet de l'hypophysectomie sur la croissance pondérale de l'Agneau C.R. Acad. Sci. Paris. 266, 388-390.
- VEZINHET, A., KHERIF, J.P. & BOUTHIER, E. (1974) Effet lipolytique in vivo de l'hormone somatotrope chez des agneaux normaux et hypophysectomisés soumis ou non à un jeûne. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 14, 781-791.
- VINI, A.I., KAPLAN, S.L. & GRUMBACH, M.M. (1973) Purification, characterization and comparaison of immunological properties of Monkey Chorionic Somatomammotropin with Human and Monkey Growth Hormone, Human Chorionic Somatomammotropins and ovine prolactin. *Endocrinology*, 92, 1051-1064.
- WALLACE, L.R. (1946) *J. Physiol.* 104, 34P.
- WALLACE, A.L.C., THORNBURN, G.D. & STACY, B.D. (1970) Degradation of growth hormone in vitro. CSIRO Anim. Physiol. Division of Australia, Sidney. p.58 (abstract).
- WALLACE, N. & NEWSHOLME, E.A. (1967) A comparison of the properties of fructose 1,6 diphosphatase and the activities of other key enzymes of carbohydrate metabolism in the liver of embryonic and adult rat, sheep and domestic fowl. *Biochem. J.* 104, 378-385.
- WALLIS, M. (1973) The primary structure of bovine growth hormone. *FEBS Letters*, 35, 11-14.
- WALLIS, M. (1974) The primary structure of bovine prolactin. *FEBS Letters*, 44, 205-208.
- WALLIS, M. (1975) The Molecular Evolution of pituitary hormones. *Biol. Rev.* 50, 35-98.
- WALLIS, M. & DAVIES, R.V. (1976) Studies on the chemistry of Bovine and Rat Growth Hormones. In *Growth Hormone and related peptides*, pp. 1-13. Eds. A. PECILE & E.E. MULLER. Excerpta Medica, Amsterdam.
- WARNES, D.M. & SEAMARK, R.F. (1977) The appearance of glucogenesis at birth in sheep. *Biochem. J.* 162, 627-634.
- WARSHAW, J.B. (1969) Cellular energy metabolism during fetal development. I. Oxidation phosphorylation in the fetal heart. *J. Cell.* 41, 651-657.
- WATSON, J.SHEPHERD, T.S. & DODSON, K.S. (1979) Prostaglandin E-2-9-Ketoreductase in ovarian tissues. *J. Reprod. Fert.* 57, 489-496.
- WIDDOWSON, E.M. (1950) Chemical composition of newly born animals, *Nature*, 166, 626-628.
- WIEDMANN, E. & SCHWARTZ, E. (1972) Suppression of growth hormone-dependant human serum sulfation factor by estrogen. *J. Clin. Endocr.* 34, 51-58.

- WIEST, W.G. (1959) Conversion of progesterone to 4-pregnen-20 α -ol-3-one by ovarian tissue in vitro. *J. Biol. Chem.* 234, 3115-3121.
- WIEST, W.G., KIDWELL, W.R., BALOGH, K. (1968) Progesterone catabolism in the rat ovary : a regulatory mechanism for progestational potency during pregnancy. *Endocrinology*. 82, 844-859.
- WILCOX, P.E., KRANT, J., WADE, R.D. & NEURATH, H. (1957) The molecular weight of α -chymotrypsinogen. *Biochim. Biophys. Acta.* 24, 72-78.
- WILLIAMS, W.F., LEE, S.D., HEAD, H.H. & LYNCH, J. (1963) Growth hormone effects on bovine blood plasma fatty acid concentration and metabolism. *J. Dairy Sci.* 46, 1405-1408.
- WILSON, L., BUTCHER, R.L. & INSKEEP, E.K. (1972) Prostaglandin F₂ in the uterus of ewes during early pregnancy. *Prostaglandins*. 1, 479-482.
- WILSON, L., CENEDELLA, R.J., BUTCHER, R.L. & INSKEEP, E.K. (1972) Levels of prostaglandins in the uterine endometrium during the ovine oestrous cycle. *J. Anim. Sci.* 34, 93-99.
- WIMSTATT, W.A. (1950) New histological observations on the placenta of the sheep. *J. of Anatomy*. 87, 391-458.
- WIMSATT, W.A. (1951) Observations on the morphogenesis, cytochemistry and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. *Am. J. of Anatomy*. 87, 391-458.
- WINTENBERGER-TORRES, S. (1967) Action de la progestérone et des stéroïdes ovariens sur la segmentation des oeufs chez la Brebis. *Annls. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 7, 391-406.
- WINTENBERGER, S. (1978) Rôle actif de l'embryon avant l'implantation. In *Implantation de l'Oeuf*. pp. 181-192. Eds. F. du MESNIL du BUISSON. A. PSYCHOYOS & K. THOMAS. Masson, Paris.
- WU, Y.V. & SCHERAGA, H.A. (1962) Studies of soybean trypsin inhibitor. I. Physiochemical properties. *Biochemistry*. 1, 698-705.
- YADLEY, R.A. & CHRAMBACH, A. (1973) Isohormones of human Growth Hormone. II. Plasmin-catalysed transformation and increase in prolactin biological activity. *Endocrinology* 93, 858-865.
- YADLEY, R.A., RODBARD, D., CHRAMBACH, A. (1973) Isohormones of human Growth Hormone. III. Isolation by preparative polyacrylamide gel electrophoresis and characterization. *Endocrinology*. 93, 866-873.
- YAMASAKI, N., KANGAWA, K., KOBAYASHI, S., KIKUTANI, M., SONENBERG, M. (1972) Amino acid sequence of a biologically active fragment of bovine growth hormone. *J. Biol. Chem.* 247, 3874-3880.
- YAMASAKI, N., KIKUTANI, M., SONENBERG, M. (1970) Peptides of a biologically active tryptic digest of bovine growth hormone. *Biochemistry*. 9, 1107-1114.
- YANAI, R., MORI, J. & NAGASAWA, H. (1977) Isolation and purification of Rat Placental Lactogen. *Jap. J. Zootechn. Sci.* 48, 667-669.
- YOSHIMI, T., STROTT, C.A., MARSHALL, J.R., LIPSETT, M.B., (1969) Corpus luteum function in early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29, 225-230.

YOUSEF, M.K., TAKAHASHI, Y., ROBERTSON, W.D., MACHLIN, L.J., JOHNSON, H. D. (1969) Estimation of growth hormone secretion rate in cattle. J. Anim. Sci. 29 341-344.

YPHANTIS, D.A. (1960) Rapid determination of molecular weights of peptides and proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 88, 586-601.

